

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392923 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.05(51) Int. Cl. C07D 473/32 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.04.15

(54) ИНГИБИТОРЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ, ИХ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/176,225

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.17

Маггани Миха, Се Синь Дженни,
Форджет Энтони, Продеус Аарон,
Язински Стефани, Пармар Рубина
Джаре (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/025075

(87) WO 2022/221696 2022.10.20

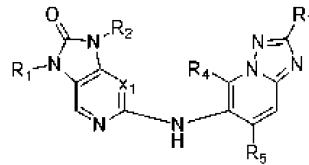
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ИНТЕЛЛИА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к ингибиторам ДНК протеинкиназы, их композициям и способам их применения. В некоторых вариантах осуществления ингибиторы характеризуются структурой формулы I



или его солью, где x_1 представляет собой C-R₃ или N; R₁ представляет собой C₁-C₃-алкил; R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆; R₃ представляет собой H или C₁-C₃-алкил; R₄ представляет собой H или C₁-C₃-алкил; R₅ представляет собой C₁-C₃-алкил; каждый R₆ независимо выбран из гидрокси, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, amino и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и R₇ представляет собой H или C₁-C₃-алкил.

A1

202392923

202392923

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579866EA/032

ИНГИБИТОРЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ, ИХ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США № 63/176225, поданной 17 апреля 2021 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники изобретения

Способность модифицировать геном любой клетки в точном положении была улучшена с недавним открытием и внедрением технологии редактирования CRISPR/Cas9. Тем не менее, способность вносить специфические направленные изменения в заданные локусы сдерживается тем, что основной путь клеточного восстановления, возникающий после Cas9-опосредованного расщепления ДНК, представляет собой ошибочное негомологичное соединение концов (НГСК). Направляемая гомологией репарация (НГР) менее эффективна, чем НГСК, что снижает эффективность редактирования в эукариотических клетках.

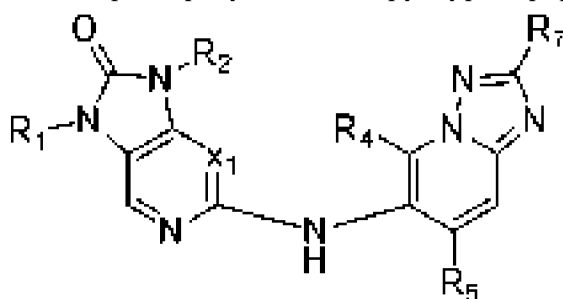
ДНК-зависимая протеинкиназа (ДНК-ПК) представляет собой ядерную серин/треониновую киназу, которая, как было показано, играет важную роль в механизме восстановления двуцепочечных разрывов ДНК. У млекопитающих преобладающим путем восстановления двунитевых разрывов ДНК является путь негомологичного соединения концов (НГСК), который функционирует независимо от фазы клеточного цикла и действует путем удаления нелигируемых концов и лигирования концов двунитевых разрывов. Ингибиторы ДНК-ПК (ДНК-ПКИ) представляют собой структурно разнообразный класс ингибиторов ДНК-ПК и НГСК-пути.

Существует значительная потребность в эффективных системах и методах модификации геномов. Также существует потребность в эффективных способах редактирования молекул нуклеиновых кислот с матричными нуклеиновыми кислотами.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к ДНК-ПКИ, а также композициям и способам их применения.

В определенных вариантах осуществления ДНК-ПКИ представляет собой соединение, характеризующееся структурой формулы I:



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амино и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил,

при условии, что применяется хотя бы одно из следующих условий:

(a) x_1 представляет собой C-R₃;

(b) R₁ представляет собой C₂-C₃ алкил;

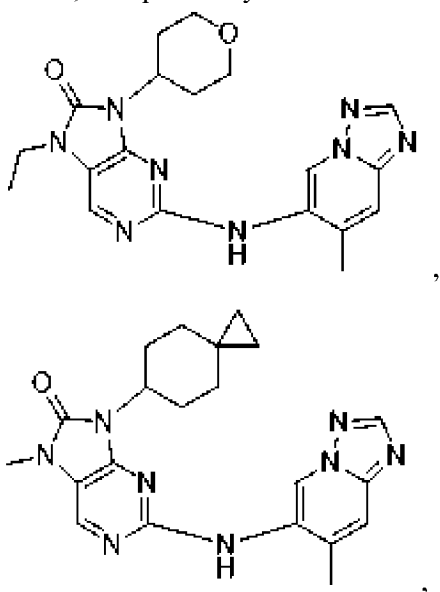
(c) R₄ представляет собой C₁-C₃ алкил;

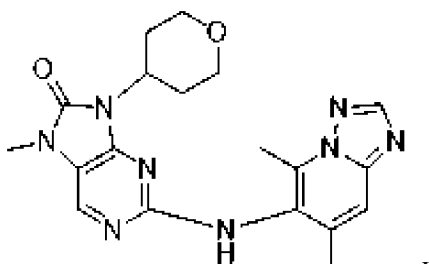
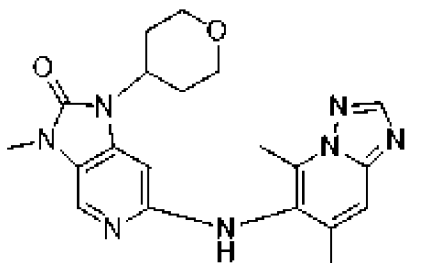
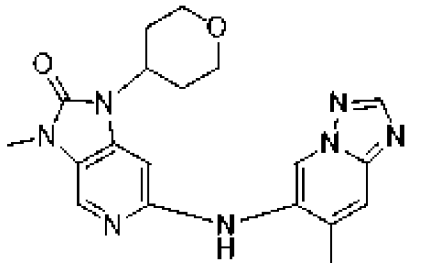
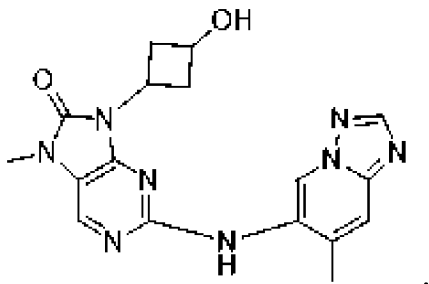
(d) R₂ замещен одним R₆, и R₆ представляет собой галоген;

(e) R₂ замещен двумя R₆, которые взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

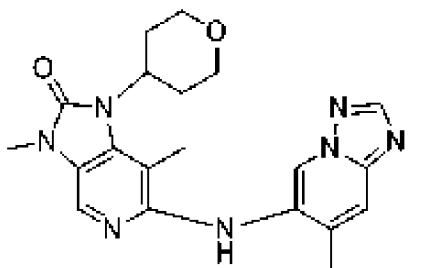
(f) R₂ представляет собой C₃-C₅ циклоалкил, необязательно замещенный одним или более R₆.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединению, выбранному из:





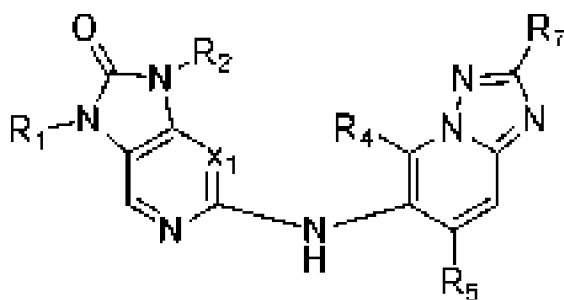
и



, или его соли.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям ДНК-ПКИ, содержащим

- a) ингибитор ДНК протеинкиназы (ДНК-ПКИ);
 - b) агент для разрезания ДНК;
 - c) необязательно клетку; и
 - d) необязательно донорскую ДНК;
- где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

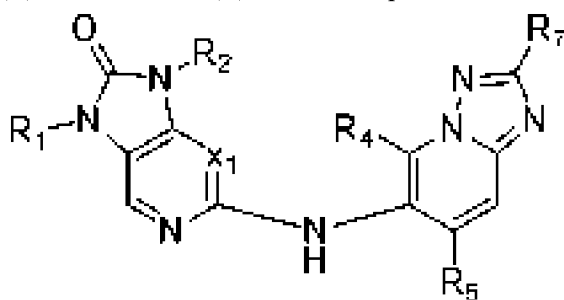
R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидрокси, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, amino и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу направленного редактирования генома клетки, или способу восстановления двунитевого разрыва ДНК в геноме клетки, или способу ингибирования или подавления восстановления разрыва ДНК в клетке путем негомологичного соединения концов (НГСК), предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амина и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1B показано влияние соединений ДНК-ПКИ на вставку GFP в локус TRAC. На фиг. 1A показан процент CD3⁺ клеток после вставки GFP в локус TRAC с соединениями (соединение 1, соединение 2, соединение 3, соединение 4, соединение 5, соединение 6, соединение 7, соединение 8 и соединение 9), и на фиг. 1B показано влияние вставки на процент CD3-клеток, которые являются GFP⁺.

На фиг. 2A-2C показано редактирование локуса TRAC с помощью соединений соединения 1, соединение 3 и соединение 4. На фиг. 2A показан процент клеток CD8⁺. На фиг. 2B показаны остаточные клетки TCR⁺ после редактирования, и на фиг. 2C показано процентное содержание клеток WT1-TCR⁺ после редактирования.

На фиг. 3A-3D показана цитотоксичность клеток WT1-T, созданных с использованием соединений соединения 1 или соединения 3. На фиг. 3A и 3B показан специфический лизис клеток 697 ALL, экспрессирующих люциферазу, при инкубации с клетками WT1-T, созданными из доноров 007HD и 008HD, соответственно. На фиг. 3C и 3D показан специфический лизис клеток K562-luc2, трансдуцированных для экспрессии HLA-A*02:01, после инкубации с клетками WT1-T, созданными из доноров 007HD и 008HD, соответственно.

На фиг. 4A-4H показано высвобождение цитокинов Т-клетками, созданными с использованием соединения 1 или соединения 3, после инкубации с клетками-мишенями. На фиг. 4A и 4B показано высвобождение гранзима В после инкубации с клетками 697 ALL и клетками K562-luc2, трансдуцированными для экспрессии HLA-A*02:01, соответственно. На фиг. 4C и 4D показано высвобождение интерферона-гамма (IFN γ) после инкубации с клетками 697 ALL и клетками K562-luc2, трансдуцированными для экспрессии HLA-A*02:01, соответственно. На фиг. 4E и 4F показано высвобождение интерлейкина-2 (IL-2) после инкубации с клетками 697 ALL и клетками K562-luc2, трансдуцированными для экспрессии HLA-A*02:01, соответственно. На фиг. 4G и 4H показано высвобождение TNF-альфа после инкубации с клетками 697 ALL и клетками K562-luc2, трансдуцированными для экспрессии HLA-A*02:01, соответственно.

На фиг. 5 показан процент негативных клеток B2M, представляющих популяцию В-клеток с эффективным нарушением генов после редактирования соединением 1 или соединением 4.

На фиг. 6A показан средний процент редактирования AAVS1, оцененный методом NGS после обработки композицией LNP и различными дозами соединения 1 или соединения 4.

На фиг. 6В показан процент клеток НК с высокой экспрессией (GFP++) после редактирования для вставки GFP в локус AAVS1 с использованием соединения 1 или соединения 4.

На фиг. 7А показан процент CD3 η ⁺, V β 8-клеток, представляющих популяцию Т-клеток без нарушения генов в локусах TRAC или TRBC1/2.

На фиг. 7В показан процент CD3 η ⁺, V β 8⁺клеток, представляющих популяцию Т-клеток со вставкой WT1 TCR в TRAC.

На фиг. 7С показан процент клеток HLA-A2-, представляющих популяцию Т-клеток с эффективным нарушением генов в локусе HLA.

На фиг. 7D показан процент клеток HLA-DRDPDQ, представляющих популяцию Т-клеток с эффективным нарушением генов в локусе СИТА.

На фиг. 7Е показан процент клеток GFP⁺, представляющих популяцию Т-клеток со вставкой GFP в локусе AAVS1.

На фиг. 7F показан процент V β 8⁺ GFP⁺ HLA-A- HLA-DRDPDQ-клеток, представляющих популяцию Т-клеток, несущих 5 геномных правок.

На фиг. 8А-8В показан процент клеток GFP⁺, представляющих популяцию Т-клеток после редактирования в альтернативных условиях среды для двух композиций LNP. На фиг. 8А показаны клетки, обработанные композициями LNP, с молярным соотношением липидов 50% ионизируемый липид/38,5% холестерин/10% DSPC/1,5% PEG-липид. На фиг. 8В показаны клетки, обработанные композициями LNP, с молярным соотношением липидов 35% ионизируемый липид/47,5% холестерин/15% DSPC/2,5% PEG-липид

На фиг. 9А показано непредусмотренное процентное структурное изменение после редактирования с использованием соединения 3 и соединения 4.

На фиг. 9В показан процент позитивных GFP клеток после редактирования с использованием соединения 3 и соединения 4.

На фиг. 10А-В показан процент инделов и процент вставки HD3 TCR в присутствии и при отсутствии ДНК-ПКИ соединения 4 при различных дозах огРНК. На фиг. 10А показан процент редактирования TRAC. На фиг. 10В показан процент CD3⁺ V β 7.2⁺ Т-клеток.

Подробное описание сущности изобретения

В данном документе описаны низкомолекулярные ингибиторы ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПКИ), которые пригодны для снижения НГСК-опосредованных событий мутагенеза или увеличения скорости или вероятности НГР после образования двуникового разрыва (DSB) в результате расщепления Cas9. Примеры ДНК-ПКИ представлены, например, в WO 2018/114999; WO 2014/183850; WO 03/024949; Fok, J.H.L., et al., Nat, Commun, 10, 5065 (2019); Griffin, R. J. et al., J. Med. Chem. 2005, 48, 569-585; Goldberg, F. W., et al., J. Med. Chem. 2020, 63, 3461–3471; и патенте США № 10,786,512.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы ДНК-ПК (ДНК-ПКИ) используются в композициях и способах доставки биологически активных средств,

включая нуклеиновые кислоты, такие как CRISPR/Cas компонентные РНК и/или гРНК («грузы»), в клетку.

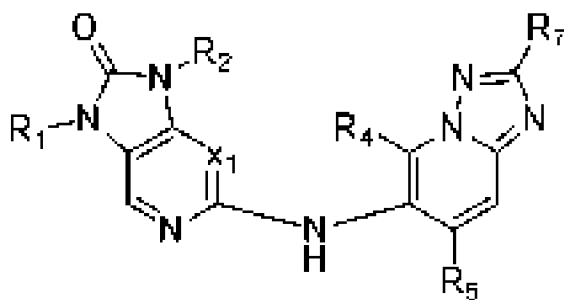
Также представлены способы редактирования генов и способы создания инженерных клеток с использованием описанных в данном документе ДНК-ПКИ и композиций, содержащих их.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, представленные в данном документе, приводят к эффективности редактирования более чем на 80%, более чем на 90% или более чем на 95%. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы приводят к эффективности редактирования около 80-95%, около 90-95%, около 80-99%, около 90-99% или около 95-99%.

Ингибиторы ДНК-ПКИ

Настоящее изобретение относится к ДНК-ПКИ, а также композициям и способам их применения.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединению, характеризующемуся структурой формулы I:



(Формула I)

или его соли,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидроксильной, галогенной, алкильной, алкоксильной, циклоалкильной, аминной и цианогруппы, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил,

при условии, что применяется хотя бы одно из следующих условий:

(a) x_1 представляет собой C-R₃;

(b) R₁ представляет собой C₂-C₃ алкил;

(c) R₄ представляет собой C₁-C₃ алкил;

(d) R₂ замещен одним R₆, и R₆ представляет собой галоген;

(e) R_2 замещен двумя R_6 , которые взяты вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

(f) R_2 представляет собой C_3 - C_5 циклоалкил, необязательно замещенный одним или более R_6 .

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где x_1 представляет собой C - R_3 . Например, R_3 может быть H или метилом. В других вариантах осуществления соединение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где x_1 представляет собой N .

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где R_1 представляет собой C_2 - C_3 алкил, например, R_1 выбран из метила и этила, предпочтительно R_1 представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где R_4 представляет собой C_1 - C_3 алкил, например, R_4 представляет собой H или метил, предпочтительно R_4 представляет собой H .

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где R_2 представляет собой циклоалкил, например, R_2 представляет собой C_3 - C_7 циклоалкил, предпочтительно R_2 представляет собой циклогексил или C_3 - C_5 циклоалкил.

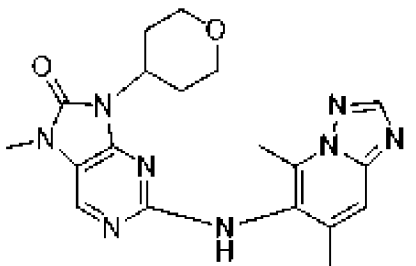
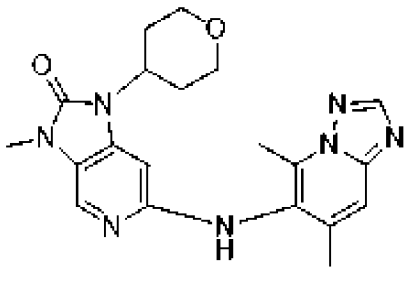
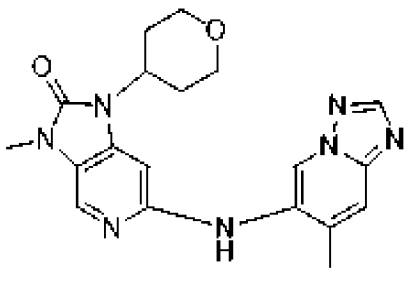
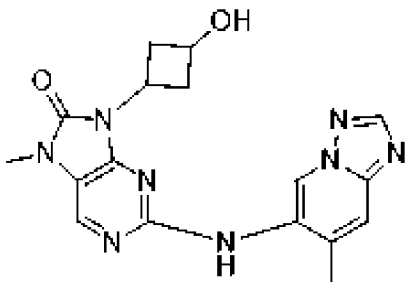
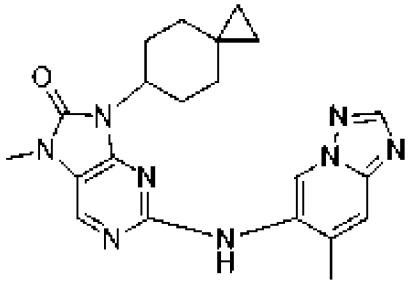
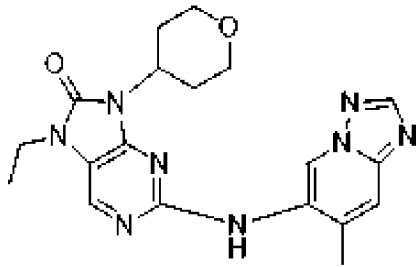
В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где R_2 представляет собой гетероциклил, например, R_2 представляет собой 5-7-членный гетероциклил, предпочтительно R_2 представляет собой тетрагидропиранил или тетрагидрофуранил. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где R_2 необязательно замещен одним или более R_6 , независимо выбранными из гидрокси, галогена и циклоалкила, или два R_6 , взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо, например, где R_2 замещен одним или более R_6 ; и каждый R_6 представляет собой галоген или гидроксил, например, R_2 замещен одним R_6 , и R_6 представляет собой галоген. В некоторых вариантах осуществления каждый R_6 представляет собой фтор. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где R_2 замещен двумя R_6 , которые взяты вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо. В конкретных вариантах осуществления R_2 необязательно замещен одним или более R_6 , независимо выбранными из гидрокси, метокси и метила.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где R_5 представляет собой метил.

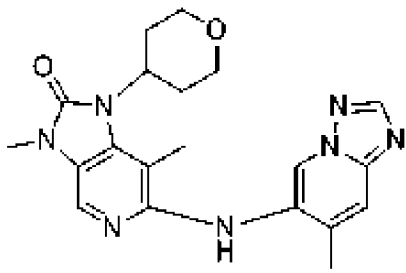
В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому

из соединений, описанных в данном документе, где R₇ представляет собой H или метил.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к соединению, выбранному из:

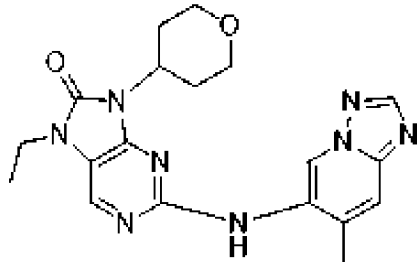


и



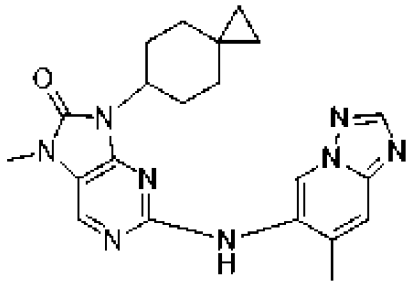
, или его соли.

В конкретных вариантах осуществления соединение представляет собой



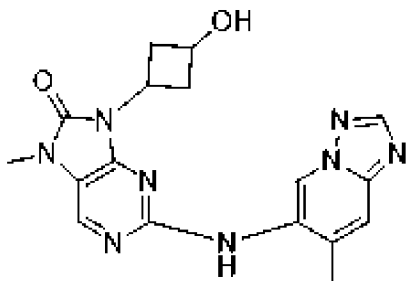
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления соединение представляет собой



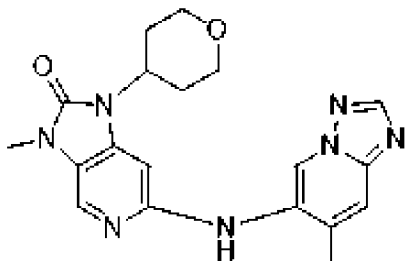
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления соединение представляет собой



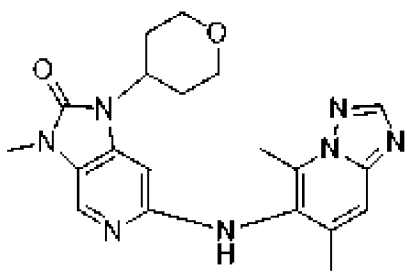
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления соединение представляет собой



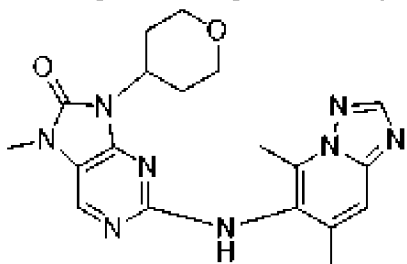
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления соединение представляет собой



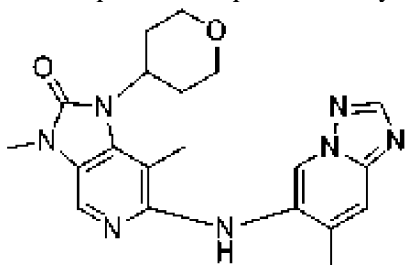
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления соединение представляет собой



, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления соединение представляет собой



, или его соль.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где соединение представляет собой свободное основание.

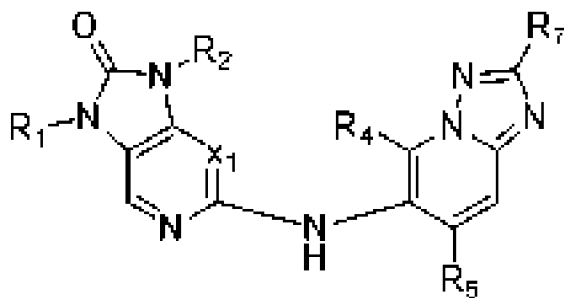
В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из соединений, описанных в данном документе, где соединение представляет собой соль, например, трифлатную соль.

Композиции ДНК-ПКИ

В настоящем изобретении представлены композиции ДНК-ПКИ, содержащие

- a) ингибитор ДНК протеинкиназы (ДНК-ПКИ);
- b) агент для разрезания ДНК;
- c) необязательно клетку; и
- d) необязательно донорскую ДНК;

где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амина и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где x_1 представляет собой N.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где R₁ представляет собой метил.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где R₄ представляет собой H.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где R₂ представляет собой циклогексил. В других вариантах осуществления R₂ представляет собой тетрагидропиранил. В еще других вариантах осуществления R₂ представляет собой тетрагидрофуранил. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где R₂ необязательно замещен одним или более R₆, независимо выбранными из гидроксигруппы, метокси и метила.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где R₅ представляет собой метил.

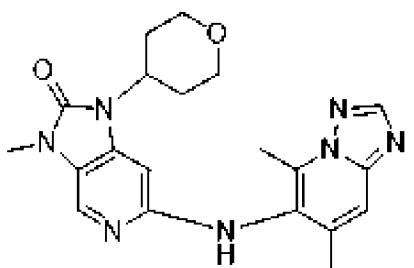
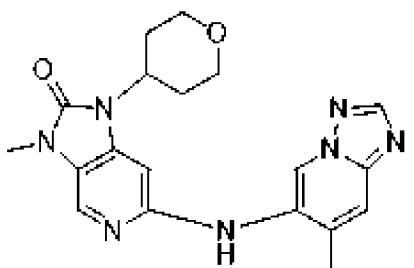
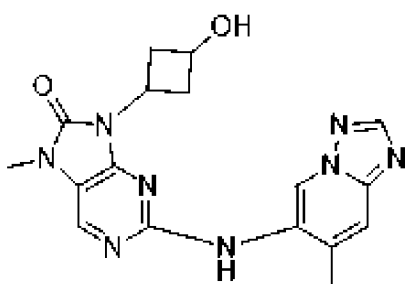
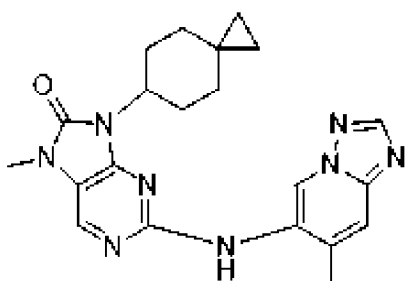
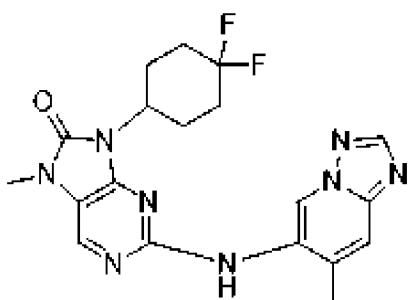
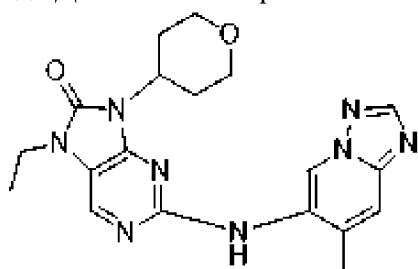
В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где R₇ представляет собой H или метил.

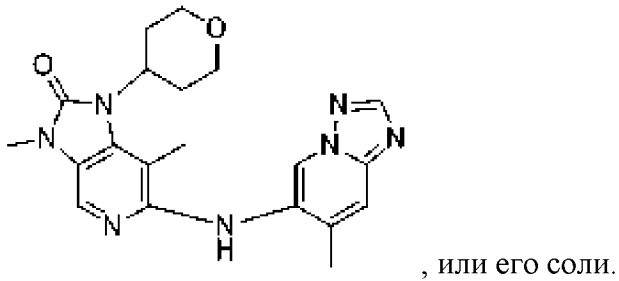
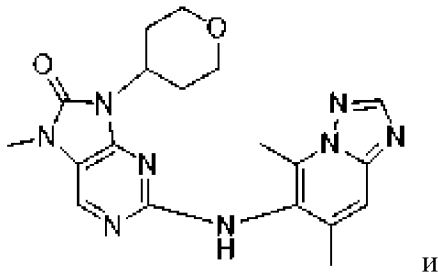
В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где ДНК-ПКИ представляет собой любое из соединений, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей

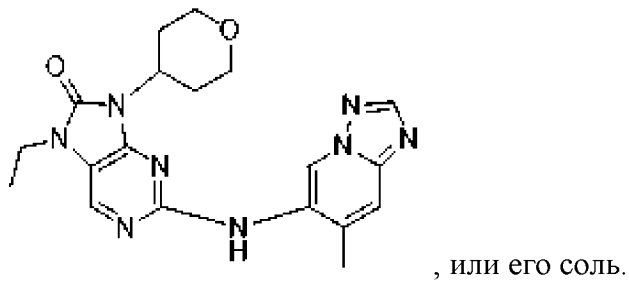
- a) ингибитор ДНК протеинкиназы (ДНК-ПКИ);
- b) агент для разрезания ДНК;
- c) необязательно клетку; и
- d) необязательно донорскую ДНК;

где ДНК-ПКИ выбран из:

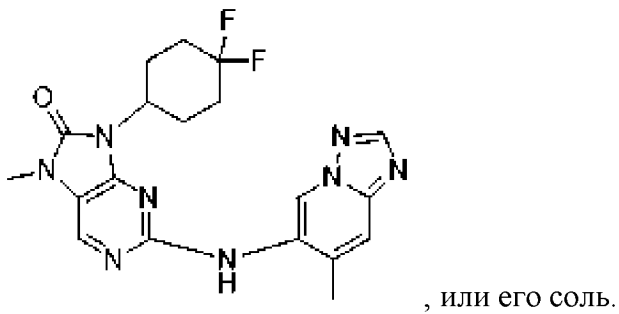




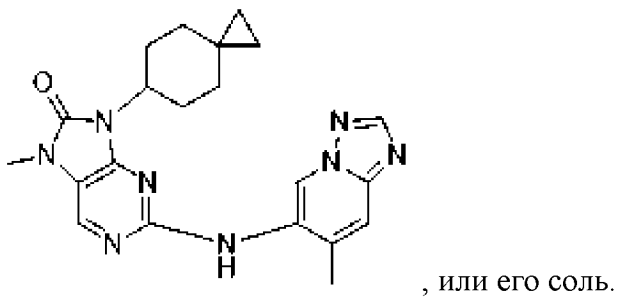
В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ в композиции представляет собой



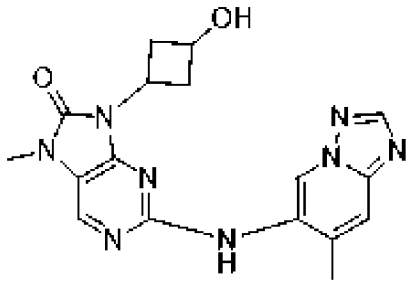
В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ в композиции представляет собой



В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ в композиции представляет собой

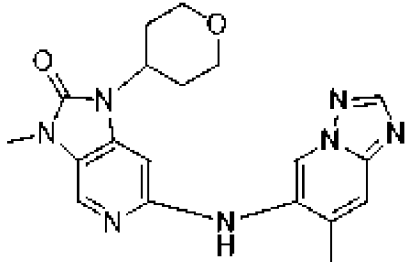


В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ в композиции представляет собой



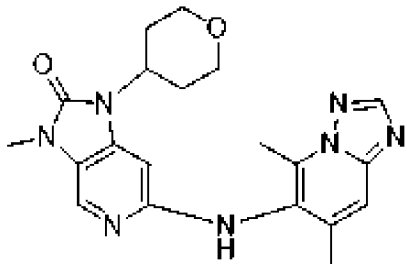
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ в композиции представляет собой



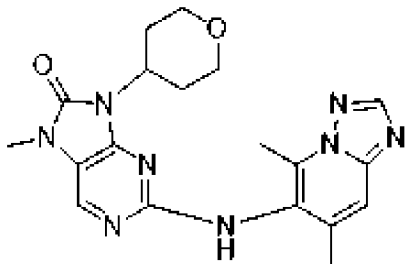
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ в композиции представляет собой



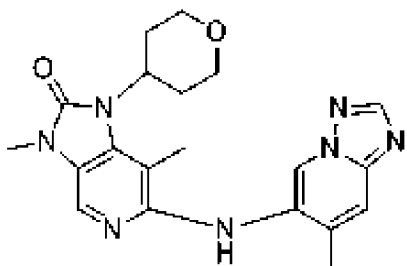
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ в композиции представляет собой



, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ в композиции представляет собой



, или его соль.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

любой из композиций, описанных в данном документе, где концентрация ДНК-ПКИ в композиции составляет около 1 мкМ или меньше, например, около 0,25 мкМ или меньше, например, около 0,1-1 мкМ, предпочтительно около 0,1-0,5 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где композиция содержит клетку, например, эукариотическую клетку, такую как клетка печени или иммунокомпетентная клетка. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где клетка применима в адоптивной клеточной терапии (АСТ). Примерами АСТ являются аутологичная и аллогенная клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где клетка представляет собой стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где клетка представляет собой стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где клетка представляет собой гематопозитическую стволовую клетку (HSC) или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где иммунокомпетентная клетка представляет собой лейкоцит или лимфоцит, например, иммунокомпетентная клетка представляет собой лимфоцит, такой как Т-клетка, В-клетка или НК-клетка, предпочтительно лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где лимфоцит представляет собой активированную Т-клетку или неактивированную Т-клетку.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где клетка представляет собой клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где агент для разрезания ДНК содержит компонент нуклеазы CRISPR/Cas и необязательно компонент гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, содержащей агент для разрезания ДНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент для разрезания ДНК, например, мРНК, кодирующую агент для разрезания ДНК, где агент для разрезания ДНК выбран из нуклеазы «цинковые пальцы», домена TALE-эффекторной нуклеазы (TALEN), нуклеазного компонента

CRISPR/Cas и их комбинаций, предпочтительно, где агент для разрезания ДНК представляет собой компонент нуклеазы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления агент для разрезания ДНК представляет собой компонент нуклеазы CRISPR/Cas и компонент гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где компонент нуклеазы CRISPR/Cas содержит нуклеазу Cas или мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, например, компонент нуклеазы CRISPR/Cas содержит мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas класса 2. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9, такую как нуклеаза Cas9 *S. pyogenes* или нуклеаза Cas9 *N. meningitidis*. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где нуклеаза Cas представляет собой Nme2Cas9. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas12a.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, содержащей модифицированную РНК.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, содержащей нуклеиновую кислоту с гидовой РНК, такую как гРНК. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где нуклеиновая кислота с гидовой РНК представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (дгРНК). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где нуклеиновая кислота с гидовой РНК представляет собой или кодирует одинарную гидовую (огРНК). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где гРНК представляет собой модифицированную гРНК, например, где модифицированная гРНК предусматривает модификацию одного или более из первых пяти нуклеотидов на 5' конце или модифицированная гРНК предусматривает модификацию одного или более из последних пяти нуклеотидов на 3' конце. В некоторых вариантах осуществления гРНК образует комплекс с нуклеазой Cas, такой как нуклеаза Cas9.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где композиция содержит нуклеиновую кислоту с гидовой РНК и нуклеазу Cas мРНК класса 2; и соотношение мРНК и нуклеиновой кислоты с гидовой РНК составляет от около 2:1 до 1:4 по массе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, содержащей агент для разрезания ДНК, где агент для разрезания ДНК присутствует в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, содержащей донорскую ДНК.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где донорская ДНК (также называемая здесь «матричная нуклеиновая кислота» или «экзогенная нуклеиновая кислота») содержит последовательность, кодирующую белок, регуляторную последовательность или последовательность, кодирующую структурную РНК.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота представляет собой композицию липидных наночастиц (LNP). В некоторых вариантах осуществления композиция LNP представляет собой любую из композиций LNP, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где LNP характеризуется диаметром около 10-200 нм, около 20-150 нм, около 50-150 нм, около 50-100 нм, около 50-120 нм, около 60-100 нм, около 75-150 нм, около 75-120 нм или около 75-100 нм. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где композиция содержит популяцию LNP со средним диаметром около 10-200 нм, около 20-150 нм, около 50-150 нм, около 50-100 нм, около 50-120 нм, около 60-100 нм, около 75-150 нм, около 75-120 нм или около 75-100 нм. Например, средний диаметр может быть Z-средним диаметром.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота представляет собой липоплекс.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит ионизируемый липид, например, любой из ионизируемых липидов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где ионизируемый липид характеризуется рКа от около 5,1 до около 8,0, например, от около 5,5 до около 7,6 или от около 5,1 до 7,4, например, от около 5,5 до 6,6, от около 5,6 до 6,4, от около 5,8 до 6,2 или от около 5,8 до 6,5.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит вспомогательный липид.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит нейтральный липид.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-

нуклеиновая кислота содержит PEG-липид

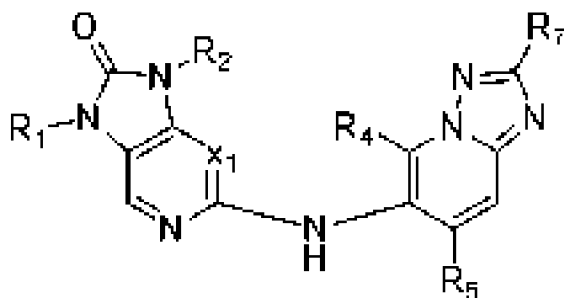
В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где соотношение N/P в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота составляет около 3-10, например, около 5-7, предпочтительно около 6.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, дополнительно содержащей вектор, например, где вектор кодирует агент для разрезания ДНК или донорскую ДНК. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где вектор представляет собой вирусный вектор. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где вектор представляет собой невирусный вектор. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где вектор представляет собой ретровирусный вектор. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, где вектор представляет собой AAV.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций, описанных в данном документе, содержащей клетку, например, где клетка не представляет собой раковую клетку.

Способы ДНК-ПКИ

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу направленного редактирования генома клетки, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C- R_3 или N;

R_1 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

R_2 представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R_6 ;

R_3 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

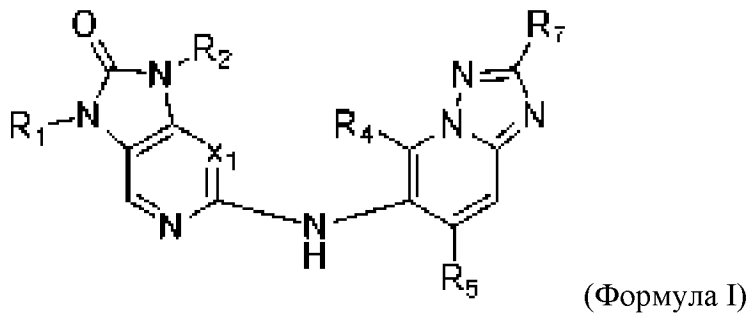
R_4 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

R_5 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

каждый R_6 независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амина и циано, или два R_6 , взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R_7 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу восстановления двунитового разрыва ДНК в геноме клетки, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



или его соль,

где:

x_1 представляет собой $C-R_3$ или N;

R_1 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

R_2 представляет собой циклоалкил или гетероцикл, и циклоалкил и гетероцикл обязательно замещены одним или более R_6 ;

R_3 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

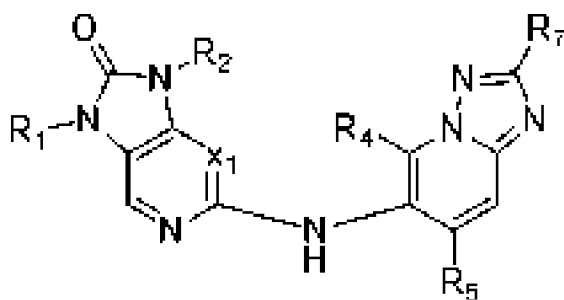
R_4 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

R_5 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

каждый R_6 независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амина и циано, или два R_6 , взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R_7 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования или подавления восстановления разрыва ДНК в клетке путем негомологического соединения концов (НГСК), предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

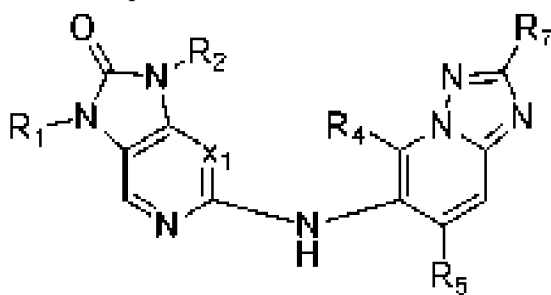
R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидрокси, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, amino и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу направленной вставки донора ДНК в геном клетки, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК, донором ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R_6 независимо выбран из гидроксидной, галогеной, алкильной, алкоксидной, циклоалкильной, аминной и циановой, или два R_6 , взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R_7 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил.

В некоторых вариантах осуществления описание относится к способам терапии на основе адоптивного переноса клеток (АСТ), например, в иммуноонкологии. Например, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном описании способы приводят к получению клеток, модифицированных по одной или более специфическим целевым последовательностям в их геноме, в том числе модифицированных путем введения систем CRISPR, включающих молекулы гРНК, которые нацелены на указанные целевые последовательности. Определенные варианты осуществления предусматривают молекулы гРНК, системы CRISPR, клетки и способы, применимые для редактирования генома иммунокомпетентных клеток, например, Т-клеток, созданных для отсутствия экспрессии эндогенного TCR, например, Т-клеток, пригодных для дальнейшей инженерии с целью вставки представляющей интерес нуклеиновой кислоты, например, Т-клеток, дополнительно созданных для экспрессии TCR, например, трансгенного TCR (tgTCR), и применимых для терапии АСТ; и для редактирования генома В-клеток, например, В-клеток, созданных для отсутствия экспрессии эндогенного В-клеточного рецептора (BCR), например, В-клеток, пригодных для дальнейшей инженерии с целью вставки представляющей интерес нуклеиновой кислоты, например, В-клеток, дополнительно сконструированных для экспрессии BCR, например, трансгенного BCR (tgBCR), или для экспрессии антитела, и применимых для терапии АСТ.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому способу редактирования гена, описанному в данном документе, включающему введение композиции LNP животному, например, человеку. В определенных вариантах осуществления способ предусматривает введение композиции LNP в клетку, например, эукариотическую, в частности, человеческую. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой тип клеток, применимых в терапии, например, в адоптивной клеточной терапии (АСТ). Примерами АСТ являются аутологичная и аллогенная клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой стволовую клетку, такую как гемопоэтическая стволовая клетка, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка или другая мультипотентная или плюрипотентная клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой стволовую клетку, например, мезенхимальную стволовую клетку, которая может развиваться в костную, хрящевую, мышечную или жировую клетку. В некоторых вариантах осуществления стволовые клетки включают глазные стволовые клетки. В определенных вариантах осуществления клетка выбрана из мезенхимальных стволовых клеток, гемопоэтических стволовых клеток (HSC), мононуклеарных клеток, эндотелиальных прогениторных клеток (EPC), нейтральных стволовых клеток (NSC), лимбальных стволовых клеток (LSC), тканеспецифических первичных клеток или клеток, полученных

из них (TSC), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), глазных стволовых клеток, плюрипотентных стволовых клеток (PSC), эмбриональных стволовых клеток (ESC), а также клеток для трансплантации органов или тканей.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему выращивание клетки в клеточной среде, не содержащей ДНК-ПКИ, и добавление ДНК-ПКИ к клеточной среде.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК перед приведением в контакт клетки с ДНК-ПКИ, например, в течение около шести часов после приведения в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК, предпочтительно в течение около трех часов после приведения в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК одновременно с ДНК-ПКИ.

Еще в других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК после приведения в контакт клетки с ДНК-ПКИ, например, в течение около трех часов после приведения в контакт клетки с агентом ДНК-ПКИ.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему выращивание клетки в клеточной среде, содержащей ДНК-ПКИ.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, в котором клетку приводят в контакт с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ в течение по меньшей мере около одного дня, например, в течение около от одного дня до одной недели, предпочтительно в течение около пяти дней.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где x_1 представляет собой N.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где R_1 представляет собой метил.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где R_4 представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где R_2 представляет собой циклогексил, тетрагидропиранил или тетрагидрофуранил. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где R_2 необязательно замещен одним или более R_6 , независимо выбранными из гидроксильных,

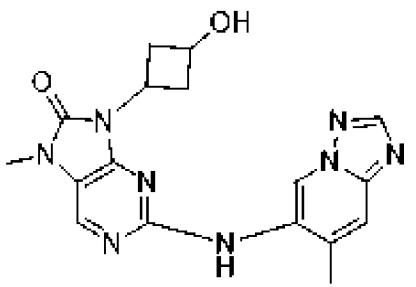
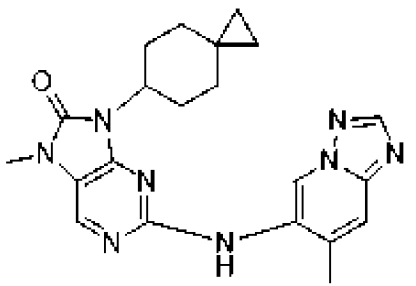
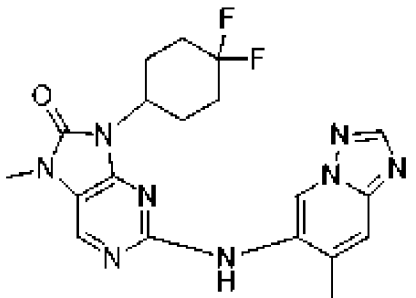
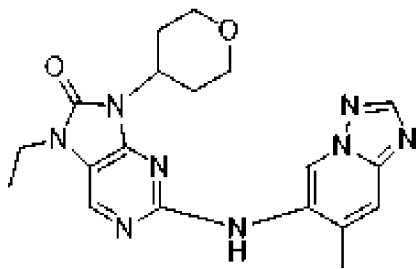
метокси и метила.

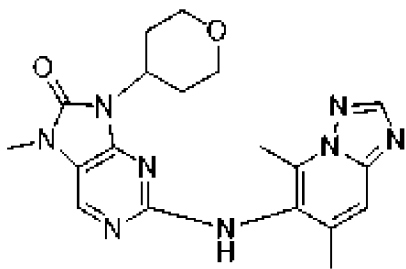
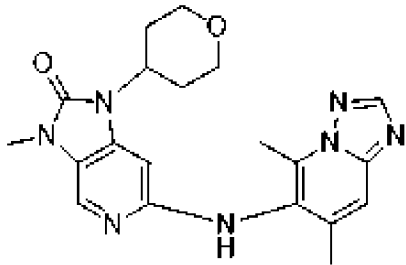
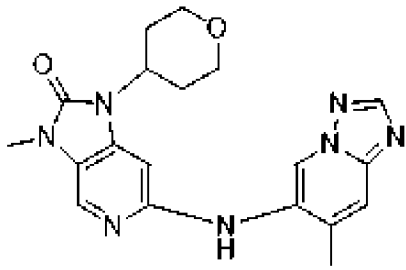
В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где R_5 представляет собой метил.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где R_7 представляет собой H или метил.

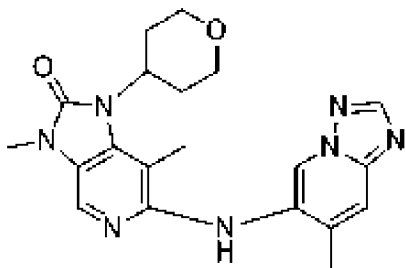
В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где ДНК-ПКИ представляет собой любое из соединений, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу направленного редактирования генома клетки, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ выбран из:



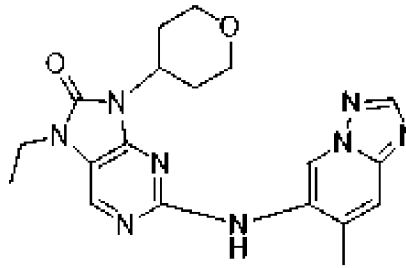


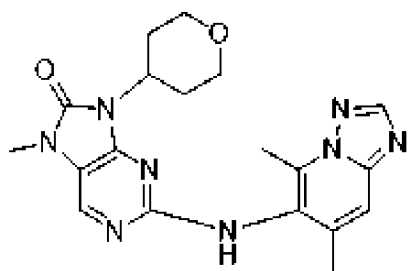
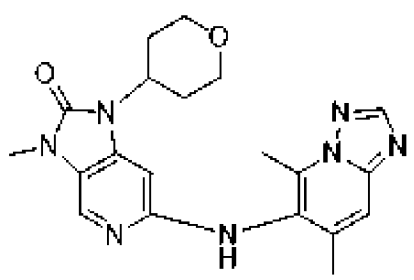
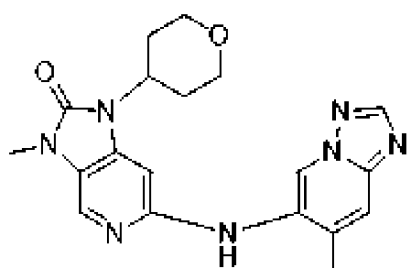
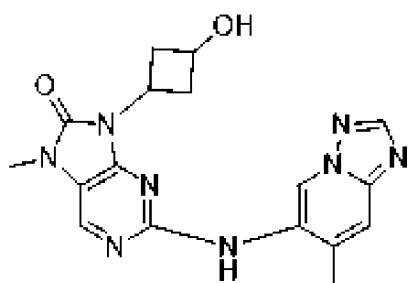
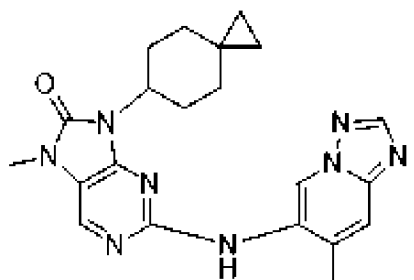
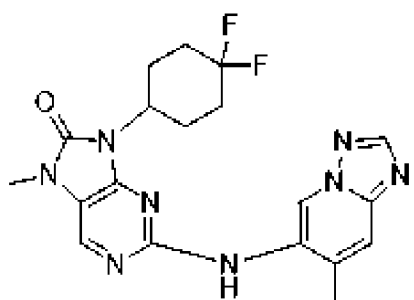
и



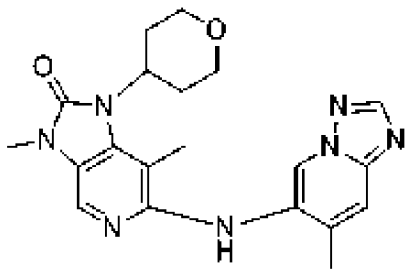
, или его соли.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу восстановления двунитевого разрыва ДНК в геноме клетки, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ выбран из:



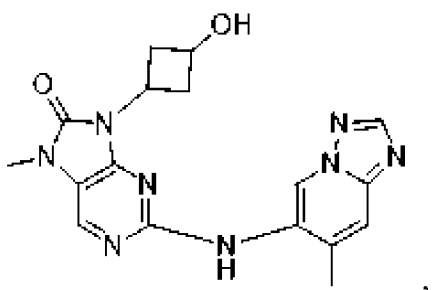
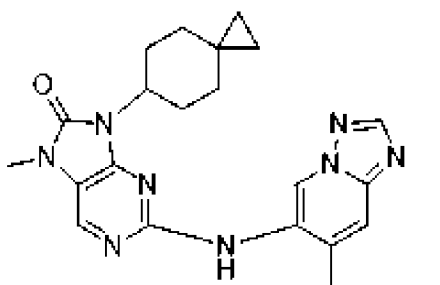
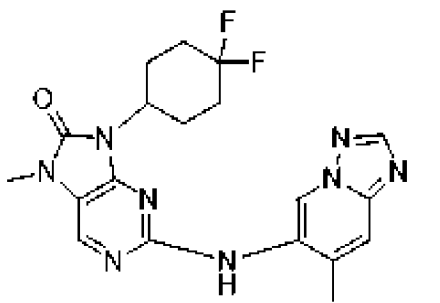
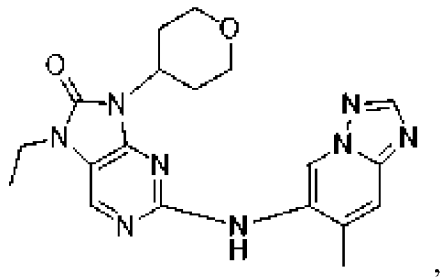


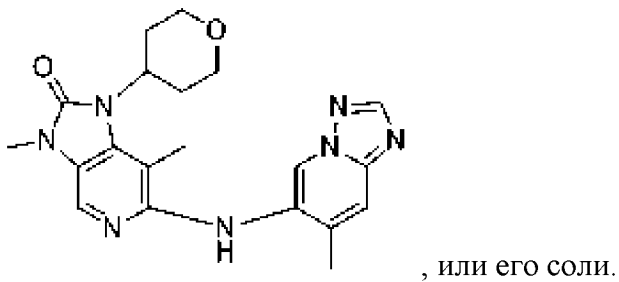
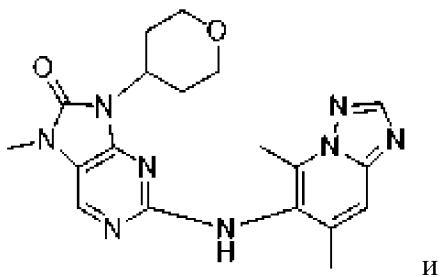
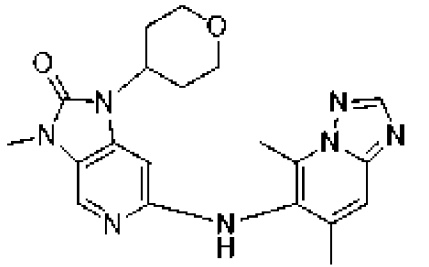
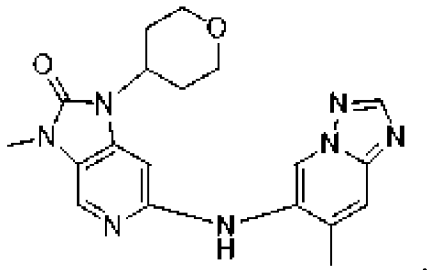
и



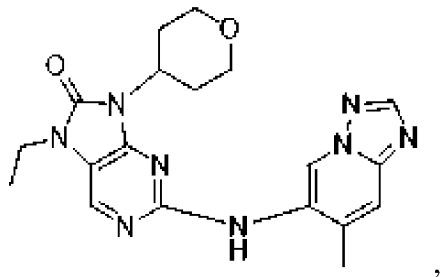
, или его соли.

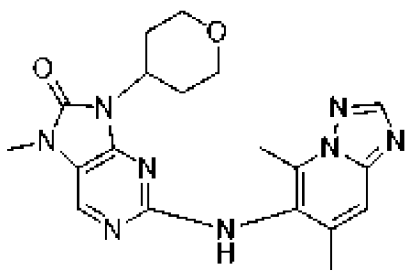
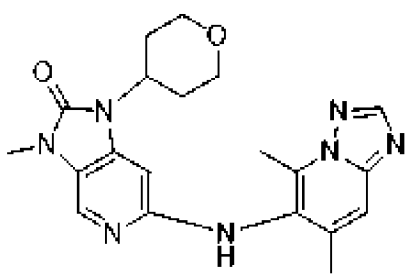
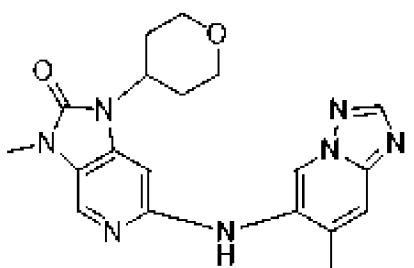
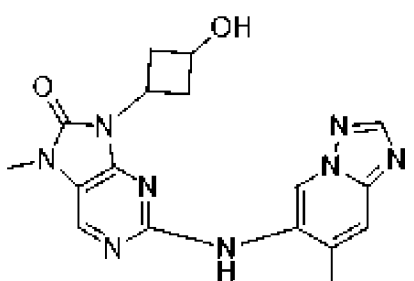
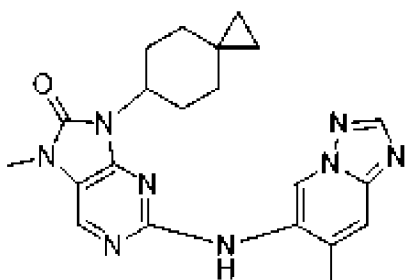
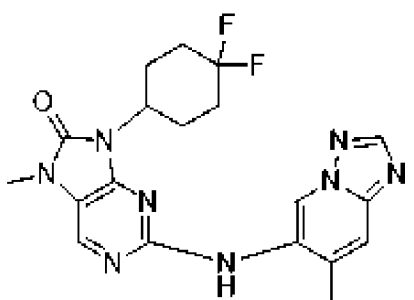
В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования или подавления восстановления разрыва ДНК в клетке путем негомологичного соединения концов (НГСК), предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ выбран из:



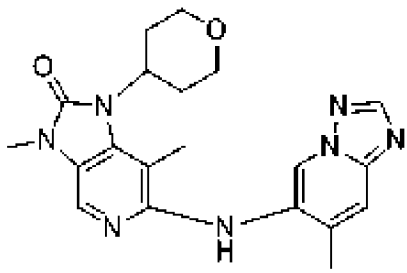


В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу направленной вставки донорской ДНК в геном клетки, предусматривающему приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК, донорской ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ выбран из:

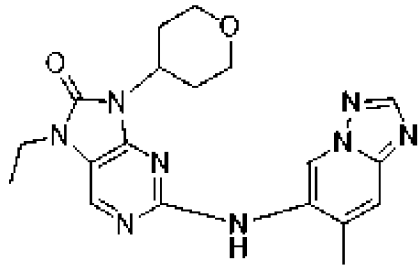




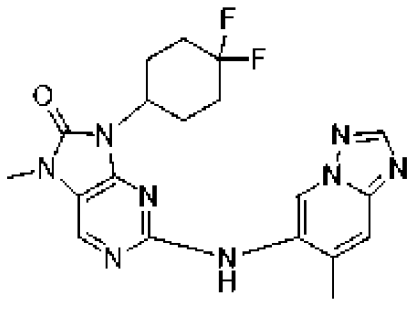
И



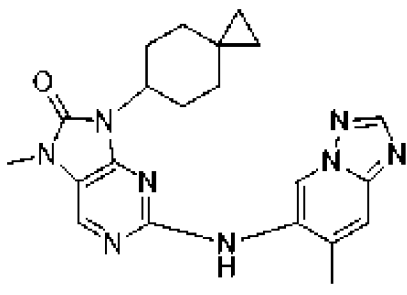
В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ, используемый в способе, представляет собой



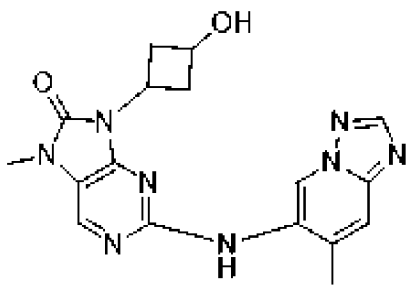
В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ, используемый в способе, представляет собой



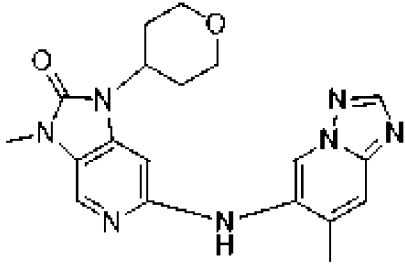
В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ, используемый в способе, представляет собой



В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ, используемый в способе, представляет собой

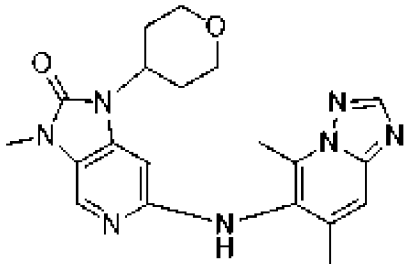


В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ, используемый в способе, представляет собой



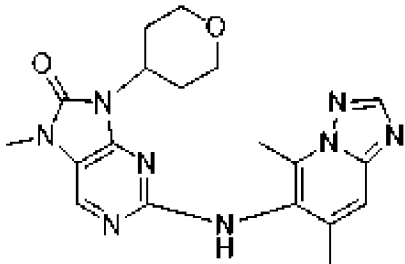
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ, используемый в способе, представляет собой



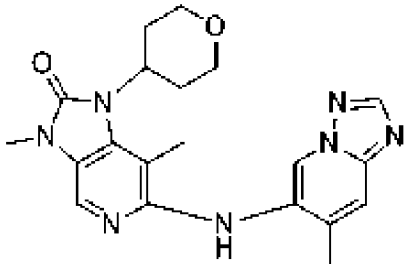
, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ, используемый в способе, представляет собой



, или его соль.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-ПКИ, используемый в способе, представляет собой



, или его соль.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, в котором клетку приводят в контакт с ДНК-ПКИ в клеточной среде, где концентрация ДНК-ПКИ в клеточной среде составляет около 1 мкМ или меньше, например, около 0,25 мкМ или меньше, так, например, около 0,1-1 мкМ, предпочтительно около 0,1-0,5 мкМ.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где клетка представляет собой

эукариотическую клетку.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где композиция содержит клетку, например, эукариотическую клетку, такую как клетка печени или иммунокомпетентная клетка. В определенных вариантах осуществления клетка применима в адоптивной клеточной терапии (АСТ). Примерами АСТ являются аутологичная и аллогенная клеточная терапия. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой стволовую клетку. В определенных вариантах осуществления стволовая клетка является гемопоэтической стволовой клеткой (HSC). В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где иммунокомпетентная клетка представляет собой лейкоцит или лимфоцит, например, иммунокомпетентная клетка представляет собой лимфоцит, такой как Т-клетка, В-клетка или НК-клетка, предпочтительно лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где лимфоцит представляет собой активированную Т-клетку или неактивированную Т-клетку.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где клетка представляет собой клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему агент для разрезания ДНК, например, где агент для разрезания ДНК выбран из нуклеазы «цинковые пальцы», домена TALE-эффекторной нуклеазы (TALEN), нуклеазного компонента CRISPR/Cas и их комбинаций, предпочтительно, где агент для разрезания ДНК представляет собой компонент нуклеазы CRISPR/Cas.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где компонент нуклеазы CRISPR/Cas содержит нуклеазу Cas или мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, например, компонент нуклеазы CRISPR/Cas содержит мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas класса 2. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9, такую как нуклеаза Cas9 *S. pyogenes* или нуклеаза Cas9 *N. meningitidis*. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где нуклеаза Cas представляет

собой Nme2Cas9. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas12a.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему модифицированную РНК.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему нуклеиновую кислоту с гидовой РНК, такую как гРНК. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где нуклеиновая кислота с гидовой РНК представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (дгРНК). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где нуклеиновая кислота с гидовой РНК представляет собой или кодирует одинарную гидовую (огРНК). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где гРНК представляет собой модифицированную гРНК, например, где модифицированная гРНК предусматривает модификацию одного или более из первых пяти нуклеотидов на 5' конце или модифицированная гРНК предусматривает модификацию одного или более из последних пяти нуклеотидов на 3' конце.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где композиция содержит нуклеиновую кислоту с гидовой РНК и нуклеазу Cas мРНК класса 2; и соотношение мРНК и нуклеиновой кислоты с гидовой РНК составляет от около 2:1 до 1:4 по массе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нуклеазу Cas класса 2 и сложную гидовую РНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему агент для разрезания ДНК, где агент для разрезания ДНК присутствует в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему донорскую ДНК.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где донорская ДНК содержит последовательность, кодирующую белок, регуляторную последовательность или последовательность, кодирующую структурную РНК.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где последовательность матрицы интегрирована в геном клетки с помощью направляемой гомологией репарации (НГР).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

любому из способов, описанных в данном документе, предусматривающему приведение в контакт клетки со сборной композицией липид-нуклеиновая кислота, содержащей агент для разрезания ДНК.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота представляет собой композицию липидных наночастиц (LNP). В некоторых вариантах осуществления композиция LNP представляет собой любую из композиций LNP, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой из композиций и способам, описанным в данном документе, где LNP характеризуется диаметром около 10-200 нм, около 20-150 нм, около 50-150 нм, около 50-100 нм, около 50-120 нм, около 60-100 нм, около 75-150 нм, около 75-120 нм или около 75-100 нм. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где композиция содержит популяцию LNP со средним диаметром около 10-200 нм, около 20-150 нм, около 50-150 нм, около 50-100 нм, около 50-120 нм, около 60-100 нм, около 75-150 нм, около 75-120 нм или около 75-100 нм. Например, средний диаметр может быть Z-средним диаметром.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота представляет собой липоплекс.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит ионизируемый липид, например, любой из ионизируемых липидов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где ионизируемый липид характеризуется рКа от около 5,1 до 7,4, так, например, от около 5,5 до 6,6, от около 5,6 до 6,4, от около 5,8 до 6,2 или от около 5,8 до 6,5.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит вспомогательный липид.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит нейтральный липид.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит PEG-липид

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где соотношение N/P в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота составляет около 3-10, например, от около 5-7, предпочтительно около 6.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, дополнительно предусматривающему вектор, например, где вектор кодирует агент для разрезания ДНК или донорскую ДНК. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где вектор представляет собой вирусный вектор. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где вектор представляет собой невирусный вектор. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где вектор представляет собой ретровирусный вектор. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где вектор представляет собой AAV.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где клетка не представляет собой клетку человека.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где агент для разрезания ДНК взаимодействует с целевой последовательностью в геноме клетки, что приводит к двуниевому разрыву ДНК (DSB).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где способ приводит к нокауту гена.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где способ приводит к коррекции гена.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому способу редактирования гена, описанному в данном документе, при этом редактирование генов приводит ко вставке. В некоторых вариантах осуществления вставка представляет собой генную вставку.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому из способов, описанных в данном документе, где донорская ДНК содержит матрицу, содержащую экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок. В определенных вариантах осуществления белок выбран из цитокина, иммуносупрессора, антитела, рецептора и фермента. В определенных вариантах осуществления белок представляет собой рецептор. В определенных вариантах осуществления рецептор выбран из иммунологического рецептора, Т-клеточного рецептора (TCR) и химерного антигенного рецептора. В определенных вариантах осуществления рецептор представляет собой иммунологический рецептор. В определенных вариантах осуществления рецептор

представляет собой TCR. В определенных вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует α -цепь TCR и/или β -цепь TCR в TCR. В определенных вариантах осуществления рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанных в данном документе, где агент для разрезания ДНК взаимодействует с целевой последовательностью в геноме клетки, что приводит к двунитевому разрыву ДНК (DSB). В определенных вариантах осуществления агент для разрезания ДНК взаимодействует с целевой последовательностью в гене TRAC T-клетки. В определенных вариантах осуществления матрица интегрирована в ген TRAC T-клетки. В определенных вариантах осуществления матрица содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, которые комплементарны последовательностям, расположенным выше или ниже сайта расщепления, соответственно.

Агент для разрезания ДНК, такой как белок, РНК или нуклеиновая кислота, кодирующая его, могут быть доставлены в клетку с помощью электропорации, доставки на основе липидов, например, с помощью сборок липид-нуклеиновая кислота, таких как липидные наночастицы, или других технологий доставки, известных в данной области.

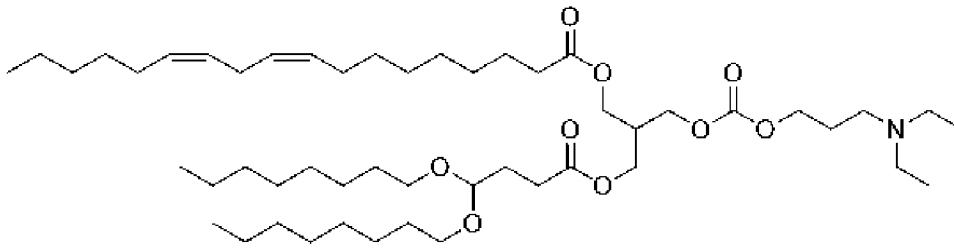
Ионизируемые липиды

В некоторых вариантах осуществления представлены способы и композиции, в которых сборки нуклеиновых кислот содержат агент для разрезания ДНК и служат для доставки агента для разрезания ДНК в клетки. Ионизируемые липиды и другие «биоразлагаемые липиды», подходящие для использования в описанных в данном документе сборках липид-нуклеиновая кислота, являются биоразлагаемыми *in vivo* или *ex vivo*. Ионизируемые липиды обладают низкой токсичностью (*например*, переносятся на животных моделях без побочных эффектов в количествах, превышающих или равных 10 мг/кг). Биоразлагаемые липиды, пригодные для применения в описанных в данном документе сборных композициях липид-нуклеиновая кислота, включают, например, биоразлагаемые липиды WO/2020/219876, WO/2020/118041, WO/2020/072605, WO/2019/067992, WO/2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086, каждая из которых настоящим включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, и конкретно ионизируемые липиды и композиции каждой из них настоящим включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления сборные композиции липид-нуклеиновая кислота содержат ионизируемый липид, такой как липид А или его эквиваленты, включая ацеталевые аналоги липида А.

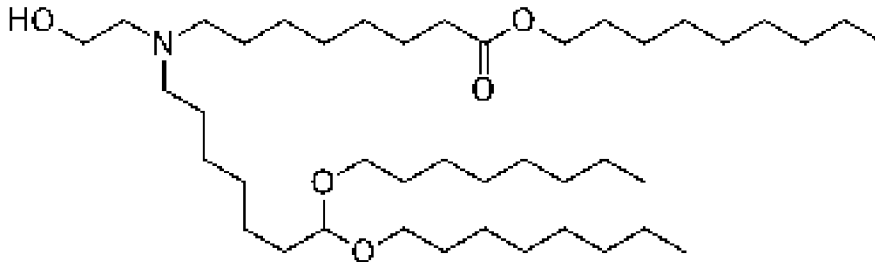
В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой липид А, который представляет собой (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилооктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат.

Липид А может быть изображен как:



Липид А может быть синтезирован в соответствии с WO2015/095340 (*например*, с. 84-86).

В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой липид D, который представляет собой нонил-8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат. Липид D может быть изображен как:



Липид D может быть синтезирован в соответствии с WO2020/072605.

Ионизируемые липиды по настоящему изобретению могут образовывать соли в зависимости от pH среды, в которой они находятся. Например, в слабокислой среде ионизируемые липиды могут быть протонированы и, таким образом, нести положительный заряд. И наоборот, в слабоосновной среде, такой как, например, кровь, где pH составляет приблизительно 7,35, ионизируемые липиды могут не протонироваться и, следовательно, не нести заряд. В некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды по настоящему изобретению могут быть преимущественно протонированы при pH по меньшей мере около 9. В некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды по настоящему изобретению могут быть преимущественно протонированы при pH по меньшей мере около 10.

pH, при котором ионизируемый липид преимущественно протонирован, связан с его истинным pKa. В некоторых вариантах осуществления соль ионизируемого липида по настоящему изобретению характеризуется pKa в диапазоне от около 5,1 до около 8,0, еще более предпочтительно от около 5,5 до около 7,6. В некоторых вариантах осуществления соль ионизируемого липида по настоящему изобретению характеризуется pKa в диапазоне от около 5,7 до около 8, от около 5,7 до около 7,6, от около 6 до около 8, от около 6 до около 7,5, от около 6 до около 7 или от около 6 до около 6,5. В некоторых вариантах осуществления соль ионизируемого липида по настоящему изобретению характеризуется pKa около 6,0, около 6,1, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,6 или около 6,6. В качестве альтернативы соль ионизируемого липида по настоящему изобретению характеризуется pKa в диапазоне от около 6 до около 8. Значение pKa может быть важным фактором при составлении LNP, поскольку было обнаружено, что LNP, составленные с

определенными липидами, что характеризуются рКа в диапазоне от около 5,5 до около 7,0, эффективны для доставки груза *in vivo*, например, в печень. Кроме того, было обнаружено, что LNP, составленные с определенными липидами, имеющими рКа в диапазоне от около 5,3 до около 6,4 эффективны для доставки *in vivo*, например в опухоли. См., например, WO 2014/136086. В некоторых вариантах осуществления ионизируемые липиды имеют положительный заряд при кислом рН, но нейтральный в крови.

Дополнительные липиды

«Нейтральные липиды», пригодные для применения в липидной композиции по настоящему изобретению, включают, например, различные нейтральные, незаряженные или цвиттерсионные липиды. Примеры нейтральных фосфолипидов, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), фосфохолин (DOPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), фосфатидилхолин (PLPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DAPC), фосфатидилэтаноламин (PE), яичный фосфатидилхолин (EPC), дилаурилоилфосфатидилхолин (DLPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин (MPPC), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолин (PMPC), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин (PSPC), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DBPC), 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидилхолин (SPPC), 1,2-диэйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), лизофосфатидилхолин, диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), дилинолеоилфосфатидилхолин дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), лизофосфатидилэтаноламин и их комбинации. В определенных вариантах осуществления нейтральный фосфолипид может быть выбран из дистеароилфосфатидилхолина (DSPC) и димиристоилфосфатидилэтаноламина (DMPE), предпочтительно дистеароилфосфатидилхолина (DSPC).

«Вспомогательные липиды» включают стероиды, стеролы и алкилрезорцинолы. Вспомогательные липиды, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения холестерин, 5-гептадецилрезорцинол и гемисукцинат холестерина. В определенных вариантах осуществления вспомогательный липид может представлять собой холестерин или его производное, такое как гемисукцинат холестерина.

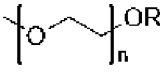
В некоторых вариантах осуществления композиции LNP включают полимерные липиды, такие как PEG-липиды, которые могут влиять на продолжительность существования наночастиц *in vivo* или *ex vivo* (например, в крови или среде). PEG-липиды могут облегчать процесс составления, например, посредством снижения агрегации частиц и управления размером частиц. PEG-липиды, применяемые в данном документе, могут модулировать фармакокинетические свойства композиций LNP. Как правило, PEG-липид содержит липидный фрагмент и полимерный фрагмент на основе PEG (в некоторых

случаях называемый поли(этиленоксид)) (PEG-фрагмент). PEG-липиды, пригодные для применения в липидной композиции по настоящему изобретению, и информацию о биохимии таких липидов можно найти в публикациях Romberg et al., *Pharmaceutical Research* 25(1), 2008, pp. 55-71 и Hoekstra et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52. Дополнительные подходящие PEG-липиды описаны, например, в WO 2015/095340 (стр. 31, строка 14 - стр. 37, строка 6), WO 2006/007712 и WO 2011/076807 («стелс-липиды»), которые включены посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления липидный фрагмент может быть получен из диацилглицерина или диацилглюкамида, включая такие, которые содержат группу диалкилглицерина или диалкилглюкамида с длиной алкильной цепи, независимо содержащей от около C4 до около C40 насыщенных или ненасыщенных атомов углерода, причем цепь может содержать одну или более функциональных групп, таких как, например, амид или сложный эфир. В некоторых вариантах осуществления длина алкильной цепи составляет от около C10 до C20. Группа диалкилглицерина или диалкилглюкамида может дополнительно содержать одну или более замещенных алкильных групп. Длины цепей могут быть симметричными или асимметричными.

Если не указано иное, применяемый в данном документе термин «PEG» означает любой полиэтиленгликоль или другой полиалкиленовый эфирный полимер, например, необязательно замещенный линейный или разветвленный полимер этиленгликоля или этиленоксида. В определенных вариантах осуществления PEG-фрагмент является незамещенным. В качестве альтернативы, PEG-фрагмент может быть замещенным, *например*, одной или более из алкильной, алкокси, ацильной, гидроксильной или арильной групп. Например, PEG-фрагмент может содержать сополимер PEG, такой как PEG-полиуретан или PEG-полипропилен (см., *например*, J.J. Milton Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1992)); в качестве альтернативы, PEG-фрагмент может представлять собой гомополимер PEG. В определенных вариантах осуществления PEG-фрагмент характеризуется молекулярной массой от около 130 до около 50 000, например, от около 150 до около 30 000 или даже от около 150 до около 20 000. Подобным образом, PEG-фрагмент может характеризоваться молекулярной массой от около 150 до около 15 000, от около 150 до около 10 000, от около 150 до около 6000 или даже от около 150 до около 5000. В определенных предпочтительных вариантах осуществления PEG-фрагмент характеризуется молекулярной массой от около 150 до около 4000, от около 150 до около 3000, от около 300 до около 3000, от около 1000 до около 3000 или от около 1500 до около 2500.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления PEG-фрагмент представляет собой «PEG-2K», также называемый «PEG 2000», который характеризуется средней молекулярной массой около 2000 дальтон. PEG-2K представлен в данном

документе формулой (III),  (III), где n равен 45, что означает, что среднечисловая степень полимеризации составляет около 45 субъединиц. Однако могут

быть применены и другие известные в данной области техники варианты PEG, в том числе, *например*, такие, в которых усредненная по числу степень полимеризации составляет около 23 субъединиц ($n=23$) и/или 68 субъединиц ($n=68$). В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 30 до около 60. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 35 до около 55. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 40 до около 50. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 42 до около 48. В некоторых вариантах осуществления n может составлять 45. В некоторых вариантах осуществления R может быть выбран из H, замещенного алкила и незамещенного алкила. В некоторых вариантах осуществления R может представлять собой незамещенный алкил, такой как метил.

В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, PEG-липид может быть выбран из PEG-дилауроилглицерина, PEG-димиристоилглицерина (PEG-DMG) (кат. № GM-020 от NOF, Токио, Япония), PEG-дипальмитоилглицерина, PEG-дистеароилглицерина (PEG-DSPE) (кат. № DSPE-020CN, NOF, Токио, Япония), PEG-дилаурилгликамида, PEG-димиристилгликамида, PEG-дипальмитоилгликамида и PEG-дистеароилглюкамида, PEG-холестерина (1-[8'-((холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диоксаоктанил)карбамоил-[омега]метилполи(этиленгликоль)), PEG-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполи(этиленгликоль)эфир), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG2k-DMPE) или 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (PEG2k-DMG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG2k-DSPE) (кат. № #880120C от Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, США), 1,2-дистеароил-sn-глицерина, метоксиполиэтиленгликоля (PEG2k-DSG; GS-020, NOF Токио, Япония), поли(этиленгликоль)-2000-диметакрилата (PEG2k-DMA) и 1,2-дистеарилоксипропил-3-амин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG2k-DSA). В определенных таких вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DMG. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DSG. В других вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DSPE. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DMA. Еще в других вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-C-DMA. В определенных вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой соединение S027, раскрытое в WO2016/010840 (абзацы [00240]-[00244]). В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-DSA. В других вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-C11. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-C14. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может представлять собой PEG2k-C16. В некоторых вариантах осуществления PEG-липид может

представлять собой PEG2k-C18.

В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид включает глицериновую группу. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид включает димиристоилглицериновую (DMG) группу. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид включает PEG-2k. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид представляет собой PEG-DMG. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид представляет собой PEG-2k-DMG. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-2k-DMG представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

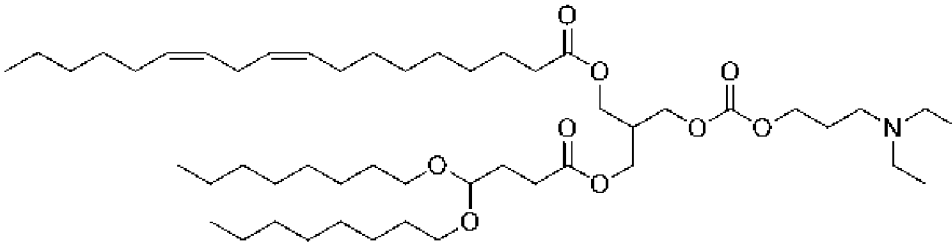
В некоторых вариантах осуществления представлены способы и композиции, в которых сборки нуклеиновых кислот содержат композицию катионного липида и агент для разрезания ДНК и служат для доставки агента для разрезания ДНК в клетки. Катионные липиды, подходящие для применения в липидных композициях, описанных в данном документе, включают без ограничения N, N-диолеил-N, N-диметиламмония хлорид (DODAC), N, N-дистеарил-N, N-диметиламмония бромид (DDAB), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N, N,N-триметиламмония хлорид (DOTAP), 1,2-диолеоил-3-диметиламмония пропан (DODAP), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N, N,N-триметиламмония хлорид (DOTMA), 1,2-диолеоилкарбамил-3-диметиламмония пропан (DOCDAP), 1,2-дILINEOIL-3-диметиламмония пропан (DLINDAP), дилаурил(C12:0) триметиламмония пропан (DLTAP), диоктадециламидоглицилспермин (DOGS), DC-Choi, диолеилокси-N-[2-(сперминкарбоксамидо)этил]-N, N-диметил-1-пропанамина трифторацетат (DOSPA), 1,2-димиристилоксипропил-3-диметилгидроксиэтиламмония бромид (DMRIE), 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис, цис-9,12-октадекадиенокси)пропан (CLinDMA), N, N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 2-[5'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)-3'-оксапентокси)-3-диметил-1-(цис, цис-9',1-2'-октадекадиенокси)пропан (CpLinDMA), N, N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин (DMOBA) и 1,2-N, N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DOcarbDAP). В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой DOTAP или DLTAP.

В дополнительных вариантах осуществления представлены способы и композиции, в которых сборки нуклеиновых кислот содержат композицию анионного липида и агент для разрезания ДНК и служат для доставки агента для разрезания ДНК в клетки. Анионные липиды, подходящие для применения в композициях, описанных в данном документе, включают без ограничения фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидную кислоту, N-додеканоилфосфатидилэтанолламин, N-сукцинилфосфатидилэтанолламин, N-глутарилфосфатидилэтанолламинхолестерина гемисукцинат (CHEMS) и лизилфосфатидилглицерин.

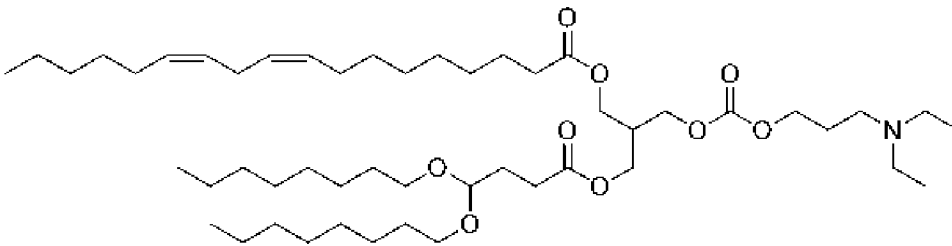
Липидные композиции

В данном документе описаны липидные композиции, содержащие по меньшей мере один ионизируемый, катионный или анионный липид, такой как ионизируемый липид или его соль (например, его фармацевтически приемлемую соль), необязательно по меньшей мере один вспомогательный липид, по меньшей мере один нейтральный липид и по меньшей мере один полимерный липид. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция содержит ионизируемый липид или его соль, нейтральный липид, вспомогательный липид и PEG-липид. В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC или DPME. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой холестерин, 5-гептадецилрезорцин или гемисукцинат холестерина.

В предпочтительных вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой

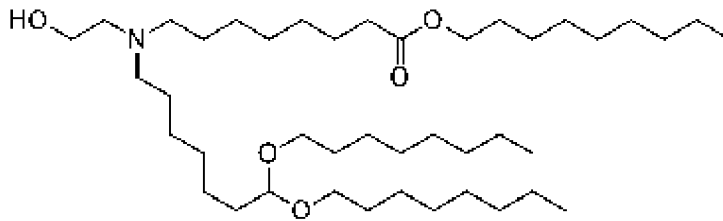


В предпочтительных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC. В предпочтительных вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой холестерин. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000. В особенно предпочтительных вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



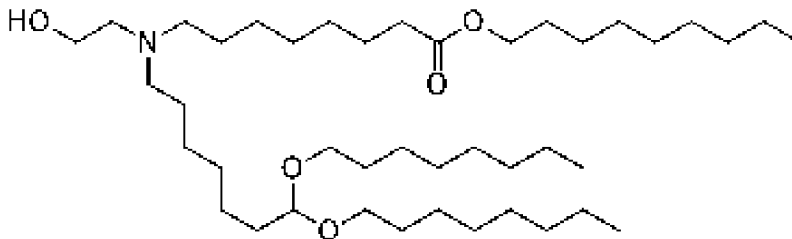
нейтральный липид представляет собой DSPC, вспомогательный липид представляет собой холестерин, а PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

В предпочтительных вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



В предпочтительных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC. В предпочтительных вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой холестерин. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



, нейтральный липид представляет собой DSPC, вспомогательный липид представляет собой холестерин, а PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

В некоторых вариантах осуществления липидная композиция дополнительно содержит один или более дополнительных липидных компонентов. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один катионный липид и/или по меньшей мере один анионный липид. В дополнительных вариантах осуществления липидная композиция дополнительно содержит катионный липид, необязательно с одним или более дополнительными липидными компонентами. В дополнительных вариантах осуществления липидная композиция дополнительно содержит анионный липид, необязательно с одним или более дополнительными липидными компонентами.

В некоторых вариантах осуществления липидная композиция представлена в форме липосомы. В предпочтительных вариантах осуществления липидная композиция представлена в форме композиции липидных наночастиц (LNP). «Липидная наночастица» или «LNP» относится, без ограничения значения, к частице, которая содержит множество (т. е. более одного) компонентов LNP, физически связанных друг с другом межмолекулярными силами. В определенных вариантах осуществления липидная композиция пригодна для доставки *in vivo*. В определенных вариантах осуществления липидная композиция пригодна для доставки в орган, например, в печень. В определенных вариантах осуществления липидная композиция пригодна для доставки в

ткань *ex vivo*. В определенных вариантах осуществления липидная композиция пригодна для доставки в клетку *in vitro*.

Липидные композиции могут быть представлены в различных формах, включая без ограничения агенты доставки, образующие частицы, включая микрочастицы, наночастицы и агенты трансфекции, которые пригодны для доставки различных молекул в клетки. Конкретные композиции эффективны для трансфекции или доставки биологически активных средств. Предпочтительными биологически активными средствами являются РНК и ДНК. В дополнительных вариантах осуществления биологически активное средство выбрано из мРНК, гРНК и ДНК. гРНК может представлять собой дгРНК или огРНК. В определенных вариантах осуществления груз включает мРНК, кодирующую РНК-направляемый агент для разрезания ДНК (*например* нуклеазу Cas, нуклеазу Cas класса 2 или Cas9), гРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую гРНК или комбинацию мРНК и гРНК.

Соединения или композиции обычно, но не обязательно, включают одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Термин «вспомогательное вещество» включает любой ингредиент, отличный от соединения(й) по настоящему изобретению, другого липидного компонента(ов) и биологически активного агента. Вспомогательное вещество может придавать композициям функциональную (*например*, контроль скорости высвобождения лекарственного средства) и/или нефункциональную (*например*, вспомогательное вещество, используемое в производственном процессе, или разбавитель) характеристику. Выбор вспомогательного вещества будет в значительной степени зависеть от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние вспомогательного вещества на растворимость и стабильность, а также природа дозированной формы.

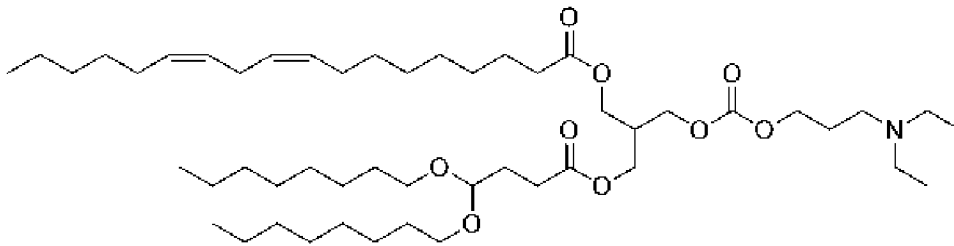
Парентеральные составы обычно представляют собой водные или масляные растворы или суспензии. Если состав является водным, вспомогательные вещества, такие как сахара (включая без ограничения соли глюкозы, маннита, сорбита *и т. п.*), углеводы и буферные агенты (предпочтительно до pH от 3 до 9), но для некоторых применений они могут быть более подходящим образом составлены со стерильным неводным раствором или в виде высушенной формы для применения в комбинации с подходящим носителем, таким как стерильная апиригенная вода (WFI).

Композиции LNP

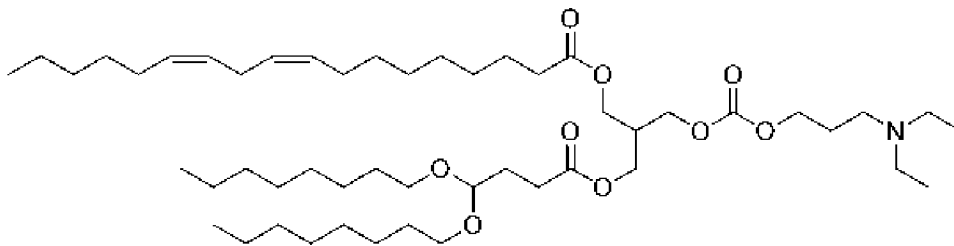
Липидные композиции могут быть представлены в виде композиций LNP, а композиции LNP, описанные в данном документе, могут быть представлены в виде липидных композиций. Липидные наночастицы могут представлять собой, например, микросферы (включая однослойные и многослойные везикулы, например, «липосомы» - липидные бислои ламелярной фазы, которые в некоторых вариантах осуществления по существу являются сферическими, и в более конкретных вариантах осуществления могут содержать водное ядро, например, содержащее существенную долю молекул РНК), дисперсную фазу в эмульсии, мицеллы или внутреннюю фазу в суспензии.

В данном документе описаны композиции LNP, содержащие по меньшей мере один ионизируемый липид или его соль (например, фармацевтически приемлемую соль), по меньшей мере один вспомогательный липид, по меньшей мере один нейтральный липид и по меньшей мере один полимерный липид. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP содержит по меньшей мере один ионизируемый липид или его фармацевтически приемлемую соль, по меньшей мере один нейтральный липид, по меньшей мере один вспомогательный липид и по меньшей мере один PEG-липид. В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC или DPME. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой холестерин, 5-гептадецилрезорцин, или гемисукцинат холестерина.

В предпочтительных вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой

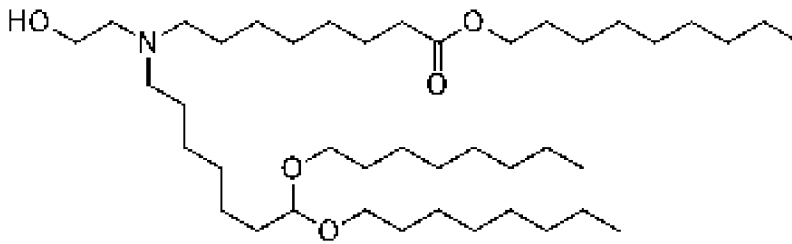


В предпочтительных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC. В предпочтительных вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой холестерин. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000. В особенно предпочтительных вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



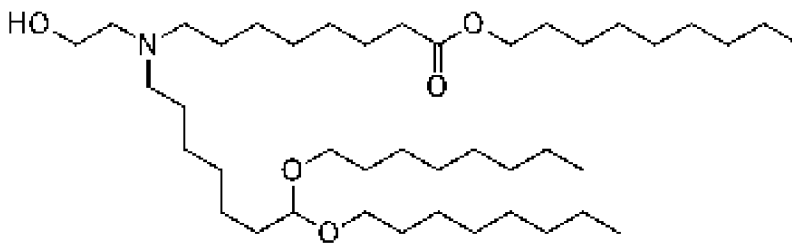
нейтральный липид представляет собой DSPC, вспомогательный липид представляет собой холестерин, а PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

В предпочтительных вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



В предпочтительных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC. В предпочтительных вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой холестерин. В предпочтительных вариантах осуществления PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой



, нейтральный липид представляет собой DSPC, вспомогательный липид представляет собой холестерин, а PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

В вариантах осуществления настоящего изобретения представлены липидные композиции, описанные согласно соответствующим молярным соотношениям компонентов липидов, входящих в состав композиции. В определенных вариантах осуществления количество ионизируемого липида составляет от около 25 моль % до около 60 моль %; количество нейтрального липида составляет от около 5 моль % до около 30 моль %; количество вспомогательного липида составляет от около 20 моль % до около 65 моль %; и количество PEG-липидов составляет от около 0,5 моль % до около 10 моль %. Все количества моль % приведены как доля липидного компонента липидной композиции или, более конкретно, композиции LNP. В некоторых вариантах осуществления липидный моль % липида по отношению к липидному компоненту будет составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от заданного, номинального или фактического моль %. В некоторых вариантах осуществления липидный моль % липида по отношению к липидному компоненту составляет ± 4 моль %, ± 3 моль %, ± 2 моль %, $\pm 1,5$ моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,5$ моль %, $\pm 0,25$ моль % или $\pm 0,05$ моль % от заданного, номинального или фактического моль % липидного компонента. В определенных вариантах осуществления липидный моль % отличается менее чем на 15%, менее чем на 10%, менее чем на 5%, менее чем на 1% или менее чем на 0,5% от заданного, номинального или фактического

моль % липида. В некоторых вариантах осуществления количество моль % основано на номинальной концентрации. В данном документе под «номинальной концентрацией» понимается концентрация, основанная на исходных количествах веществ, объединенных с образованием полученной композиции. Например, если в 1 л воды добавлено 100 мг растворителя, то номинальная концентрация составляет 100 мг/л. В некоторых вариантах осуществления количество моль % основано на фактической концентрации, например, на концентрации, определенной аналитическим методом. В некоторых вариантах осуществления фактическая концентрация липидов липидного компонента может быть определена, например, с помощью хроматографии, такой как жидкостная хроматография, с последующим применением метода обнаружения, такого как обнаружение заряженного аэрозоля. В некоторых вариантах осуществления фактическая концентрация липидов липидного компонента может быть охарактеризована с помощью липидного анализа, AF4-MALS, NTA и/или крио-ЕМ. Все количества моль % приведены в процентах к содержанию липидов в липидном компоненте композиции LNP.

В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит агент для разрезания ДНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит полипептидный агент для разрезания ДНК, необязательно в комбинации с нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит нуклеиновокислотный агент для разрезания ДНК, такой как РНК, что кодирует нуклеазу или нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления водный компонент представляет собой компонент нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления компонент нуклеиновой кислоты содержит ДНК и его можно назвать компонентом ДНК. В некоторых вариантах осуществления компонент нуклеиновой кислоты содержит РНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент, такой как компонент РНК, может содержать мРНК, например, мРНК, кодирующую РНК-направляемый агент для разрезания ДНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК представляет собой нуклеазу Cas. В определенных вариантах осуществления водный компонент может содержать мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, например, Cas9. В определенных вариантах осуществления агент для разрезания ДНК представляет собой мРНК нуклеазы Cas. В определенных вариантах осуществления агент для разрезания ДНК представляет собой мРНК нуклеазы Cas класса 2. В определенных вариантах осуществления агент для разрезания ДНК представляет собой мРНК нуклеазы Cas9. В определенных вариантах осуществления водный компонент может содержать модифицированную РНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент может содержать нуклеиновую кислоту с гидовой РНК. В определенных вариантах осуществления водный компонент может содержать гРНК. В определенных вариантах осуществления водный компонент может содержать дгРНК. В определенных вариантах осуществления водный компонент может содержать модифицированную гРНК. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, композиция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту гРНК,

такую как гРНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит РНК-направляемый агент для разрезания ДНК и гРНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит мРНК нуклеазы Cas и гРНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит мРНК нуклеазы Cas класса 2 и гРНК.

В определенных вариантах осуществления липидная композиция, например, композиция LNP, может содержать мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, например, нуклеазу Cas класса 2, ионизируемый липид или его фармацевтически приемлемую соль, вспомогательный липид, необязательно нейтральный липид и PEG-липид. В определенных композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, например, нуклеазу Cas класса 2, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В других композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, например, нуклеазу Cas класса 2, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, в частности, Cas-нуклеазу класса 2, например, Cas9, PEG-липид представляет собой PEG2k-DMG. В конкретных композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, в частности, Cas-нуклеазу класса 2, и ионизируемый липид или его фармацевтически приемлемую соль. В определенных композициях композиция дополнительно содержит гРНК, такую как дгРНК или огРНК.

В некоторых вариантах осуществления липидная композиция, например, композиция LNP, может содержать гРНК. В определенных вариантах осуществления композиция может содержать ионизируемый липид или его фармацевтически приемлемую соль, гРНК, вспомогательный липид, необязательно нейтральный липид и PEG-липид. В определенных композициях LNP, содержащих гРНК, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В некоторых композициях, содержащих гРНК, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих гРНК, PEG-липид представляет собой PEG2k-DMG. В определенных композициях гРНК выбрана из дгРНК и огРНК.

В определенных вариантах осуществления липидная композиция, например, композиция LNP, содержит мРНК, кодирующую РНК-направляемый агент для разрезания ДНК и гРНК, которая может быть огРНК, в водном компоненте и ионизируемый липид в липидном компоненте. Например, композиция LNP может содержать ионизируемый липид или его фармацевтически приемлемую соль, мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, гРНК, вспомогательный липид, нейтральный липид и PEG-липид. В определенных композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, и гРНК, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, и гРНК, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, и гРНК, PEG-липид представляет собой PEG2k-DMG.

В определенных вариантах осуществления липидные композиции, например,

композиции LNP, включают РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, например, мРНК Cas класса 2, и по меньшей мере одну гРНК. В некоторых вариантах осуществления гРНК представляет собой огРНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК представляет собой мРНК Cas9. В определенных вариантах осуществления композиция LNP включает соотношение гРНК и мРНК РНК-направляемого агента для разрезания ДНК, такого как мРНК нуклеазы Cas класса 2 около 1:1 или около 1:2. В некоторых вариантах осуществления соотношение по массе составляет от около 25:1 до около 1:25, от около 10:1 до около 1:10, от около 8:1 до около 1:8, от около 4:1 до около 1:4, от около 2:1 до около 1:2, от около 2:1 до 1:4 по массе или от около 1:1 до около 1:2.

Композиции и способы, раскрытые в данном документе, могут включать матричную нуклеиновую кислоту, например, матрицу ДНК. Матричная нуклеиновая кислота может быть доставлена одновременно с липидными композициями, содержащими ионизируемый липид или его фармацевтически приемлемую соль, или отдельно от них, в том числе в виде композиций LNP. В некоторых вариантах осуществления матричная нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной, в зависимости от необходимого механизма восстановления. Матрица может иметь области гомологии с целевой ДНК, например, в последовательности целевой ДНК, и/или с последовательностями, смежными с целевой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления композиции LNP составлены путем смешивания водного раствора РНК с раствором липида на основе органического растворителя. Подходящие растворы или растворители включают или могут содержать: воду, PBS, Трис-буфер, NaCl, цитратный буфер, ацетатный буфер, этанол, хлороформ, диэтиловый эфир, циклогексан, тетрагидрофуран, метанол, изопропанол. Например, органическим растворителем может быть 100% этанол. Можно применять фармацевтически приемлемый буфер, *например*, для введения композиций LNP *in vivo*. В определенных вариантах осуществления буфер применяется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, на уровне pH 6,5 или выше. В определенных вариантах осуществления буфер применяется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, на уровне pH 7,0 или выше. В определенных вариантах осуществления композиция имеет pH в диапазоне от около 7,2 до около 7,7. В дополнительных вариантах осуществления композиция имеет pH в диапазоне от около 7,3 до около 7,7 или в диапазоне от около 7,4 до около 7,6. pH композиции может быть измерено с помощью микродетектора pH. В определенных вариантах осуществления в композицию включают криопротектор. Неограничивающие примеры криопротекторов включают сахарозу, трегалозу, глицерин, ДМСО и этиленгликоль. Иллюстративные композиции могут содержать до 10% криопротектора, такого как, например, сахароза. В определенных вариантах осуществления композиция может содержать трис-солевой раствор сахарозы (TSS). В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой композицию LNP, которая может включать около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% криопротектора. В

определенных вариантах осуществления композиция представляет собой композицию LNP, которая может включать около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% сахарозы. В некоторых вариантах осуществления композиция включает буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может содержать фосфатный буфер (PBS), Трис-буфер, цитратный буфер и их смеси. В определенных иллюстративных вариантах осуществления буфер содержит NaCl. В определенных вариантах осуществления буфер не содержит NaCl. Иллюстративные количества NaCl могут варьироваться от около 20 мМ до около 45 мМ. Иллюстративные количества NaCl могут варьироваться от около 40 мМ до около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления количество NaCl составляет около 45 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой Трис-буфер. Иллюстративные количества Трис могут варьироваться от около 20 мМ до около 60 мМ. Иллюстративные количества Трис могут варьироваться от около 40 мМ до около 60 мМ. В некоторых вариантах осуществления количество Трис составляет около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит NaCl и Трис. Определенные иллюстративные варианты осуществления композиций содержат 5% сахарозы и 45 мМ NaCl в Трис-буфере. В других иллюстративных вариантах осуществления композиции содержат сахарозу в количестве около 5% масс./об., около 45 мМ NaCl и около 50 мМ Трис при pH 7,5. Количество соли, буфера и крипротектора могут варьироваться таким образом, чтобы поддерживать осмолярность всей композиции. Например, конечная осмолярность может поддерживаться на уровне менее 450 мОсм/л. В других вариантах осуществления осмолярность составляет от 350 до 250 мОсм/л. В определенных вариантах осуществления конечная осмолярность составляет 300 +/- 20 мОсм/л или 310 +/- 40 мОсм/л.

В некоторых вариантах осуществления применяется микрофлюидное смешивание, Т-смешивание или перекрестное смешивание водного раствора РНК и раствора липида в органическом растворителе с получением композиции LNP. В определенных аспектах скорости потока, размер соединения, геометрия соединения, форма соединения, диаметр трубки, растворы и/или концентрации РНК и липидов могут варьироваться. LNP или композиции LNP можно концентрировать или очищать, *например*, с помощью диализа, центробежного фильтра, фильтрации в тангенциальном потоке или хроматографии. Композиции LNP могут храниться, например, в виде суспензии, эмульсии или лиофилизированного порошка. В некоторых вариантах осуществления композицию LNP хранят при температуре 2-8°C, в определенных аспектах композиции LNP хранят при комнатной температуре. В дополнительных вариантах осуществления композицию LNP хранят в замороженном виде, например, при -20°C или -80°C. В других вариантах осуществления композицию LNP хранят при температуре в диапазоне от около 0°C до около -80°C. Замороженные композиции LNP можно размораживать перед применением, например, на льду, при комнатной температуре или при 25°C.

Предпочтительные липидные композиции, такие как композиции LNP, являются биоразлагаемыми, поскольку они не накапливаются до цитотоксических уровней *in vivo*

при терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления композиции не вызывают врожденного иммунного ответа, приводящего к существенным побочным эффектам при терапевтическом уровне дозы. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в данном документе, не вызывают токсичности при уровне терапевтической дозы.

В некоторых вариантах осуществления концентрация LNP в композиции LNP составляет около 1-10 мкг/мл, около 2-10 мкг/мл, около 2,5-10 мкг/мл, около 1-5 мкг/мл, около 2-5 мкг/мл, около 2,5-5 мкг/мл, около 0,04 мкг/мл, около 0,08 мкг/мл, около 0,16 мкг/мл, около 0,25 мкг/мл, около 0,63 мкг/мл, около 1,25 мкг/мл, около 2,5 мкг/мл или около 5 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления для определения индекса полидисперсности (PDI) и размера LNP по настоящему изобретению может быть применено динамическое рассеивание света («DLS»). DLS измеряет рассеивание света, которое возникает в результате воздействия на образец источника света. PDI, определяемый по результатам измерений DLS, представляет собой распределение частиц по размерам (вокруг среднего размера частиц) в популяции, причем в идеально однородной популяции PDI равен нулю.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе LNP имеют PDI от около 0,005 до около 0,75. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе LNP имеют PDI от около 0,005 до около 0,1. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе LNP имеют PDI от около 0,005 до около 0,09, от около 0,005 до около 0,08, от около 0,005 до около 0,07 или от около 0,006 до около 0,05. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют PDI от около 0,01 до около 0,5. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют PDI от около нуля до около 0,4. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют PDI от около нуля до около 0,35. В некоторых вариантах осуществления PDI LNP может варьироваться от около нуля до около 0,3. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют PDI, что может варьироваться от около нуля до около 0,25. В некоторых вариантах осуществления PDI LNP может варьироваться от около нуля до около 0,2. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют PDI от около нуля до около 0,05. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют PDI от около нуля до около 0,01. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют PDI менее около 0,01, около 0,02, около 0,05, около 0,08, около 0,1, около 0,15, около 0,2 или около 0,4.

Размер LNP может быть измерен различными аналитическими способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления размер LNP может быть измерен с помощью системы асимметричного проточного фракционирования частиц в поперечном гравитационном поле - многоугольного рассеяния света (AF4-MALS). В определенных вариантах осуществления размер LNP может быть измерен путем разделения частиц в композиции по гидродинамическому радиусу с последующим измерением молекулярных масс, гидродинамических радиусов и

среднеквадратичных радиусов фракционированных частиц. В некоторых вариантах осуществления размер и концентрация частиц LNP могут быть измерены с помощью анализа отслеживания наночастиц (NTA, Malvern Nanosight). В определенных вариантах осуществления образцы LNP соответствующим образом разбавляют и наносят на предметное стекло микроскопа. Камера регистрирует рассеянный свет, когда частицы медленно диффундируют через поле зрения. После записи видео программа Nanoparticle Tracking Analysis обрабатывает его, отслеживая пиксели и рассчитывая коэффициент диффузии. Этот коэффициент диффузии может быть преобразован в гидродинамический радиус частицы. С помощью таких методов можно также подсчитывать количество отдельных частиц для определения концентрации частиц. В некоторых вариантах осуществления размер, морфология и структурные характеристики LNP могут быть определены с помощью криоэлектронной микроскопии («cryo-EM»).

LNP композиций LNP, описанных в данном документе, например, характеризуются размером (*например*, Z-средний диаметр) от около 1 до около 250 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 10 до около 200 нм. В дополнительных вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 20 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 50 до около 150 нм или от около 70 до 130 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 50 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 50 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 60 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 75 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 75 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 75 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 50 до около 145 нм, от около 50 до около 120 нм, от около 50 до около 120 нм, от около 50 до около 115 нм, от около 50 до около 100 нм, от около 60 до около 145 нм, от около 60 до около 120 нм, от около 60 до около 115 нм или от около 60 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером менее чем около 145 нм, менее чем около 120 нм, менее чем около 115 нм, или менее чем около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления размер LNP составляет более около 50 нм или более около 60 нм. В некоторых вариантах осуществления размер частиц представляет собой Z-средний размер частиц. В некоторых вариантах осуществления размер частицы представляет собой среднечисловое значение. В некоторых вариантах осуществления размер частиц представляет собой размер отдельной LNP. Если не указано иное, все размеры, упомянутые в данном документе, представляют собой средние размеры (диаметры) полностью сформированных наночастиц, измеренные путем динамического рассеяния света на Malvern Zetasizer или Wyatt NanoStar. Образец наночастиц разбавляют в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS), так что интенсивность составляет приблизительно 200-400 килоимпульсов в секунду.

LNP могут характеризоваться размером (*например*, Z-средний диаметр) от около 1 до около 250 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 10 до около 200 нм. В дополнительных вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 20 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 50 до около 150 нм или от около 70 до 130 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 50 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 50 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 60 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 75 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 75 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 75 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP характеризуются размером от около 40 до около 125 нм, от около 40 до около 110 нм, от около 40 до около 100 нм, от около 40 до около 90 нм. В некоторых вариантах осуществления размер частиц представляет собой Z-средний размер частиц. В некоторых вариантах осуществления размер частицы представляет собой среднечисловое значение. В некоторых вариантах осуществления размер частиц представляет собой размер отдельной LNP. Если не указано иное, все размеры, упомянутые в данном документе, представляют собой средние размеры (диаметры) полностью сформированных наночастиц, измеренные путем динамического рассеяния света на Malvern Zetasizer или Wyatt NanoStar. Образец наночастиц разбавляют в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS), так что интенсивность составляет приблизительно 200-400 килоимпульсов в секунду.

В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 50% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 50% до около 95%. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 70% до около 90%. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 90% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 75% до около 95%. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 90% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 95% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 98% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 99% до около 100%.

Груз

Груз, доставляемый с помощью композиции LNP, может представлять собой агент для разрезания ДНК, такой как РНК-направляемый агент для разрезания ДНК. В определенных вариантах осуществления груз представляет собой или содержит один или более агентов для разрезания ДНК, таких как мРНК, гРНК, вектор экспрессии, РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, например, нуклеазу Cas CRISPR или мРНК, кодирующую нуклеазу, необязательно в комбинации с гидовой РНК. Приведенный выше список агентов для разрезания ДНК является только иллюстративным и не предназначен для ограничения. Такие соединения могут быть очищены или частично очищены, могут иметь природное происхождение или быть синтетическими, и могут быть химически модифицированными.

Груз, доставляемый с помощью композиции LNP, может представлять собой РНК, такую как молекула мРНК, кодирующая агент для разрезания ДНК. Например, включены мРНК для экспрессии белка, такого как РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, или нуклеазы Cas. Представлены композиции LNP, которые включают мРНК нуклеазы Cas, например, мРНК нуклеазы Cas класса 2, которая обеспечивает экспрессию в клетках нуклеазы Cas класса 2, например, белок Cas9 или Cpf1 (также называемый Cas12a). Кроме того, груз может содержать одну или более гРНК или нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК. Матричная нуклеиновая кислота, *например*, для репарации или рекомбинации, также может быть использована в описанных в данном документе способах. В подварианте осуществления груз содержит мРНК, которая кодирует Cas9 *Streptococcus pyogenes*, и необязательно гРНК *S. pyogenes*. В дополнительном подварианте осуществления груз содержит мРНК, которая кодирует Cas9 *Neisseria meningitidis*, и необязательно гРНК Nme (*Neisseria meningitidis*).

Термин «мРНК» относится к полинуклеотиду и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (*m. e.* может служить субстратом для трансляции с помощью рибосомы и аминокислотированной тРНК). мРНК может содержать сахарофосфатный остов, включающий остатки рибозы или их аналоги, *например*, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления сахара сахарофосфатного остова мРНК состоят в основном из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации. Как правило, мРНК не содержат существенного количества остатков тимидина (*например*, 0 остатков или менее 30, 20, 10, 5, 4, 3 или 2 остатков тимидина; или содержание тимидина менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% или 0,1%). мРНК может содержать модифицированные уридины в некоторых или во всех своих положениях уридина.

Агенты для разрезания ДНК

В некоторых вариантах осуществления композиции или способы содержат агент для разрезания ДНК, такой как компонент белка или РНК, или нуклеиновую кислоту, кодирующую его. Как используется в данном документе, термин агент для разрезания ДНК представляет собой любой компонент системы редактирования генома (или системы

редактирования генов), необходимый или пригодный для внесения изменений в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам доставки агента для разрезания ДНК системы редактирования генома (например, системы нуклеаза «цинковые пальцы», системы TALEN, системы мегануклеаз или системы CRISPR/Cas) в клетку (или популяцию клеток). Агенты для разрезания ДНК включают, например, нуклеазы, способные осуществлять одно- или двунитевые разрывы в ДНК или РНК клетки, *например*, в геноме клетки, и нуклеиновые кислоты, кодирующие их, такие как РНК. Агенты для разрезания ДНК, *например*, нуклеазы, могут необязательно модифицировать геном клетки без расщепления нуклеиновой кислоты или никазы. Нуклеазный или никазный агент для разрезания ДНК может быть кодирован с помощью мРНК. Такие нуклеазы и никазы включают, например, РНК-направляемые агенты для разрезания ДНК, и компоненты CRISPR/Cas. Агенты для разрезания ДНК включают слитые белки, включая, например, никазу, слитую с эффекторным доменом, таким как редактор домена. Агенты для разрезания ДНК включают любой компонент, необходимый или полезный для осуществления редактирования генома, что вводит разрыв ДНК, такой как, например, гидовая РНК, оРНК, дгРНК и т. п.

В данном документе описаны различные подходящие системы редактирования генов, содержащие агенты для разрезания ДНК для применения с соединениями ДНК-ПКИ, включая без ограничения систему CRISPR/Cas; систему нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN); и систему эффекторных нуклеаз, подобную активатору транскрипции (TALEN). Как правило, агенты для разрезания ДНК включают применение сконструированных систем расщепления для индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) или разрыва (например, одноцепочечного разрыва или SSB) в целевой последовательности ДНК. Расщепление или разрез может происходить с помощью специфических нуклеаз, таких как сконструированные ZFN, TALEN, или с помощью системы CRISPR/Cas со сконструированной гидовой РНК для управления специфическим расщеплением или разрывом целевой последовательности ДНК. Кроме того, на основе системы Argonaute разрабатываются направленные нуклеазы (например, из *T. thermophilus*, известного как «TtAgo», см. Swarts et al (2014) Nature 507(7491): 258-261), которые также могут иметь потенциал для применения в редактировании генома и генной терапии.

В некоторых вариантах осуществления описанные композиции содержат один или более агентов, модифицирующих ДНК, например, агент для разрезания ДНК. В описанные в данном документе композиции LNP могут быть включены различные модифицирующие ДНК агенты. Например, к агентам, модифицирующим ДНК, относятся нуклеазы (как специфичные, так и неспецифичные), топоизомеразы, метилазы, ацетилазы, химические, фармацевтические и другие агенты. В некоторых вариантах осуществления белки, связывающиеся с определенной последовательностью ДНК или набором последовательностей, могут быть применены для индуцирования модификации ДНК, например, разрыва нити. Белки могут быть модифицированы различными способами,

например, с помощью встраивания ^{125}I , радиоактивный распад которого приводит к разрыву нити, или модифицирующими кросс-связывающими реагентами, такими как 4-азидофенацилбромид, образующими сшивку с ДНК при облучении УФ-светом. Такие сшивки белок-ДНК могут быть впоследствии преобразованы в двухцепочечный разрыв ДНК путем обработки пиперидином. Еще один подход к модификации ДНК предполагает применение антител, выращенных против специфических белков, связанных с одним или большим количеством участков ДНК, таких как факторы транскрипции или архитектурные белки хроматина, и применяемых для выделения ДНК из нуклеопротеиновых комплексов.

В некоторых вариантах осуществления описанные композиции содержат один или более агентов для разрезания ДНК. К агентам для разрезания ДНК относятся такие технологии, как нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN), нуклеазы с эффекторами, подобными активаторам транскрипции (TALEN), мито-TALEN и мегануклеазы. В технологиях TALEN и ZFN применяется стратегия привязки каталитических доменов эндонуклеаз к модульным ДНК-связывающим белкам для индуцирования направленных двухцепочечных разрывов ДНК (DSB) в определенных геномных локусах. Дополнительные агенты для разрезания ДНК включают малые интерферирующие РНК, микроРНК, антимикроРНК, антагонисты, малые шпилечные РНК и аптамеры (на основе РНК, ДНК или пептидов (включая аффимеры)).

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов представляет собой систему TALEN. Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), представляют собой рестрикционные ферменты, которые можно сконструировать для разрезания определенных последовательностей ДНК. Их получают путем слияния эффекторного ДНК-связывающего домена TAL с доменом расщепления ДНК (нуклеаза, которая разрезает нити ДНК). Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), могут быть сконструированы для связывания с желаемой последовательностью ДНК, чтобы способствовать расщеплению ДНК в определенных местах (см., например, Boch, 2011, Nature Biotech). Ферменты рестрикции могут быть введены в клетки для применения в геномном редактировании или для редактирования генома *in situ* -техника, известная как редактирование генома с помощью сконструированных нуклеаз. Такие способы и композиции для их применения известны в данной области техники. См., например, WO 2019147805, WO 2014040370, WO 2018073393, содержание которых в данный документ включено посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов представляет собой систему «цинковые пальцы». Нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN) представляют собой искусственные рестрикционные ферменты, генерируемые путем слияния ДНК-связывающего домена «цинковые пальцы» с доменом расщепления ДНК. Домены «цинковые пальцы» могут быть сконструированы для нацеливания на определенные желаемые последовательности ДНК, чтобы позволить нуклеазам «цинковые пальцы» нацеливаться на уникальные последовательности в комплексных геномах. Домен

неспецифического расщепления эндонуклеазы рестрикции II типа FokI обычно применяется в качестве домена расщепления в ZFN. Расщепление восстанавливается с помощью эндогенного механизма репарации ДНК, что позволяет ZFN точно изменять геномы высших организмов. Такие способы и композиции для их применения известны в данной области техники. См., например, WO 2011091324, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

В предпочтительных вариантах осуществления описанные композиции содержат мРНК, кодирующую агент для разрезания ДНК, такую как нуклеаза Cas. В конкретных вариантах осуществления описанные композиции содержат мРНК, кодирующую нуклеазу Cas класса 2, например, Cas9 *S. pyogenes*.

Как используется в данном документе, термин «РНК-направляемый агент для разрезания ДНК» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих ДНК-связывающей и разрезающей активностью, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, где ДНК-связывающая активность является специфической для последовательности и зависит от последовательности РНК, способной к введению разрыва оцДНК или дцДНК. Типовые РНК-направляемые агенты для разрезания ДНК включают клевазы/никазы Cas и их инактивированные формы («агенты для разрезания ДНК dCas»). Используемый в данном документе термин «нуклеаза Cas» охватывает клевазы Cas, никазы Cas и агенты для разрезания ДНК dCas. Клевазы/никазы Cas и агенты для разрезания ДНК dCas включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и нуклеазы Cas класса 2. Используемый в данном документе термин «нуклеаза Cas класса 2» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-разрезающей активностью. Нуклеазы Cas класса 2 включают клевазы/никазы Cas класса 2 (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно имеют направляемой РНК активностью клеваз или приказ ДНК, и агенты для разрезания ДНК dCas класса 2, в которых активность клевазы/никазы инактивирована. К нуклеазам Cas класса 2, которые могут быть применены с композициями LNP, описанными в данном документе, относятся, например, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (например, N692A, M694A, Q695A, H698A), белки eSPCas9(1.0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (например, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., *Cell*, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки во всей их полноте. См., например, Zetsche, таблицы 2 и 4. См., например, Makarova et al., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

Неограничивающие иллюстративные виды, из которых может быть получена нуклеаза Cas, включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*,

Wolinella succinogenes, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor becscii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria sp.*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus sp.*, *Lachnospiraceae bacterium ND2006* и *Acaryochloris marina*.

В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. В других вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus thermophilus*. В еще других вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Francisella novicida*. В других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Acidaminococcus sp.* В еще других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Lachnospiraceae bacterium ND2006*. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* или *Porphyromonas macacae*. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нецелевую цепь ДНК, а домен HNH расщепляет целевую цепь ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9

представляет собой Cas9 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Cas9 способна индуцировать разрыв двухцепочечной цепи в целевой ДНК. В других вариантах осуществления нуклеаза Cas может расщеплять дцДНК, она может расщеплять одну цепь дцДНК или может не обладать клявальной или никазной активностью в отношении ДНК. В некоторых вариантах осуществления две никазы объединяются для создания разрыва дцДНК.

В некоторых вариантах осуществления используется нуклеаза Cas, такая как химерная нуклеаза Cas, где один домен или область белка слиты с частью другого белка, например, гетерологичного полипептида, и необязательно содержит линкерный полипептид между частью нуклеазы Cas и частью гетерологичного функционального домена химерной Cas9. В некоторых вариантах осуществления домен нуклеазы Cas может быть слитым, например, с помощью линкера, с доменом из другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой модифицированную нуклеазу, такую как никаза или dCas9.

В других вариантах осуществления нуклеаза Cas или никаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой компонент комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой белок Cas3. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может иметь активность расщепления РНК.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК обладает одноцепочечной никазной активностью, *т. е.* может разрезать одну цепь ДНК с образованием разрыва одной цепи, также известного как «разрез». В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК содержит никазу Cas. Никаза представляет собой фермент, который создает разрез в дцДНК, *т. е.*, разрезает одну цепь, но не другую цепь двойной спирали ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas представляет собой вариант нуклеазы Cas (*например*, рассмотренной выше), в которой активный сайт эндонуклеолиза инактивирован, *например*, путем одного или более изменений (*например*, точечных мутаций) в каталитическом домене. См., *например*, патент США № 8,889,356 для получения информации о Cas никазах и типовых изменениях каталитических доменов. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas, такая как никаза Cas9, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК модифицируют так, что он содержит только один функциональный домен нуклеазы. Например, белок-агент может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы мутирует, или полностью, или частично удаляется, чтобы снизить его активность по расщеплению нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления применяют никазу, имеющую домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых

вариантах осуществления применяют никазу, имеющую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления применяют никазу, имеющую домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления применяют никазу, имеющую неактивный домен HNH.

В некоторых вариантах осуществления консервативную аминокислоту в домене белка нуклеазы Cas замещают для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015). Другие типовые аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности *Francisella novicida* U112 Cpf1 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN))).

В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующая никазу, представлена в комбинации с парой гидовых РНК, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В данном варианте осуществления гидовые РНК направляют никазу на целевую последовательность и вводят DSB путем образования зарубок на противоположных цепях целевой последовательности (*т. е.* двойная зарубка). В некоторых вариантах осуществления применение двойного одноцепочечного разрыва может улучшать специфичность и уменьшать побочные эффекты. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного одноцепочечного разрыва в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза применяется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, которые выбраны так, чтобы они находились в непосредственной близости, для создания двойного разреза в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза, такая как никаза Cas9, слита с гетерологичным функциональным доменом, таким как полипептид дезаминазы.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК не обладает нуклеазной и никазной активностью. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК содержит ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, при этом по существу не обладает каталитической (нуклеазной/никазной) активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, не обладающий нуклеазной или никазной активностью, или ДНК-

связывающий полипептид dCas представляет собой вариант нуклеазы Cas (*например*, описанной выше нуклеазы Cas), в котором ее эндонуклеолитические активные сайты инактивированы, *например* путем одного или более изменений (*например*, точечных мутаций) в ее каталитических доменах. См., *например*, заявку на патент США № 2014/0186958 A1; заявку на патент США № 2015/0166980 A1.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК содержит один или более гетерологичных функциональных доменов (*например*, представляет собой или содержит слитый полипептид).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может облегчать транспорт РНК-направляемого агента для разрезания ДНК в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (NLS).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может быть способен модифицировать внутриклеточное время полужизни РНК-направляемого агента для разрезания ДНК. В некоторых вариантах осуществления период полужизни РНК-направляемого агента для разрезания ДНК может быть увеличен. В некоторых вариантах осуществления период полужизни РНК-направляемого агента для разрезания ДНК может быть уменьшен. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может быть способен повышать стабильность РНК-направляемого агента для разрезания ДНК. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может быть способен снижать стабильность РНК-направляемого агента для разрезания ДНК. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для разрушения белка. В некоторых вариантах осуществления разрушение белка может быть опосредовано протеолитическими ферментами, такими как, например, протеасомы, лизосомальные протеазы или кальпаин-протеазы. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может содержать PEST-последовательность. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК может быть модифицирован путем добавления убиквитина или полиубиквитиновой цепи. В некоторых вариантах осуществления убиквитин может представлять собой убиквитин-подобный белок (UBL). Неограничивающие примеры убиквитин-подобных белков включают малый убиквитин-подобный модификатор (SUMO), убиквитиновый перекрестно-реактивный белок (UCRP, также известный как стимулируемый интерфероном ген-15 (ISG15)), связанный с убиквитином модификатор-1 (URM1), белок 8, подавляющий экспрессию набора генов в предшественниках нервных клеток в процессе развития (NEDD8, также называемый Rub1 в *S. cerevisiae*), белок, ассоциированный с антигеном F лейкоцитов человека (FAT10), белок аутофагии-8 (ATG8) и 12 (ATG12), убиквитин-подобный белок Fau (FUB1), закрепленный на мембране UBL (MUB), убиквитин-свернутый модификатор 1 (UFM1) и убиквитин-подобный белок-5 (UBL5).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен

может представлять собой маркерный домен. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают в себя флуоресцентные белки, метки для очистки, эпитопные метки и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах осуществления маркерный домен может представлять собой флуоресцентный белок. Неограничивающие примеры пригодных флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (*например*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, Monomeric Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (*например*, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (*например*, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), голубые флуоресцентные белки (*например*, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (*например*, mKate, mKate2, mPlum, мономер DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, мономер DsRed, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, мономерный Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой пригодный флуоресцентный белок. В других вариантах осуществления маркерный домен может представлять собой метку для очистки и/или эпитопную метку. Неограничивающие примеры меток включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP), мальтозосвязывающий белок (MBP), тиоредоксин (TRX), поли(NANP), метку для тандемной аффинной очистки (TAP), мус, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, белок-носитель биотин-карбоксила (BCCP), поли-His и кальмодулин. Неограничивающие примеры репортерных генов включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый агент для разрезания ДНК на конкретную органеллу, тип клетки, ткань или орган. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый агент для разрезания ДНК на митохондрии.

В других вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может представлять собой эффекторный домен, например, редакторский домен. Если РНК-направляемый агент для разрезания ДНК направлен на его целевую последовательность, *например*, если нуклеаза Cas направлена на целевую последовательность с помощью гРНК, эффекторный домен, такой как редакторный домен, может модифицировать целевую последовательность или воздействовать на нее. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен, такой как редактор домена, может быть выбран из связывающего нуклеиновые кислоты домена, домена нуклеазы (*например*, домена отличной от нуклеазы Cas), домена эпигенетической модификации, активирующего транскрипцию домена или домена транскрипционного репрессора. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу,

такую как нуклеаза FokI. См., *например*, патент США № 9,023,649. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен представляет собой транскрипционный активатор или репрессор. См., *например*, Qi et al., «Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression», *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., «RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9- based transcription factors», *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali et al., «CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering», *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert et al., «CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes», *Cell* 154:442-51 (2013). Поскольку РНК-направляемый агент для разрезания ДНК по существу становится фактором транскрипции, который может быть направлен на связывание желаемой целевой последовательности с применением направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления домен модификации ДНК представляет собой домен метилирования, например, домен деметилирования или метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен представляет собой домен модификации ДНК, такой как домен, редактирующий основания. В конкретных вариантах осуществления домен модификации ДНК представляет собой домен, редактирующий нуклеиновые кислоты, который вводит специфическую модификацию в ДНК, такой как дезаминазный домен. См., *например*, WO 2015/089406; заявку на патент США № 2016/0304846. Домены, редактирующие нуклеиновую кислоту, дезаминазные домены и варианты Cas9, описанные в WO 2015/089406 и заявке на патент США № 2016/0304846, включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК или никаза Cas, такая как никаза Cas9, содержат дезаминазу АРОВЕС. В некоторых вариантах осуществления дезаминаза АРОВЕС представляет собой дезаминазу АРОВЕС3, такую как АРОВЕС3А (АЗА). В некоторых вариантах осуществления АЗА представляет собой АЗА человека. В некоторых вариантах осуществления АЗА представляет собой АЗА дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый агент для разрезания ДНК содержит редактор. Примером редактора является BC22n, который содержит АРОВЕС3А *H. sapiens*, слитую с никазой Cas9 *S. pyogenes*-D10A с помощью линкера XTEN. В некоторых вариантах осуществления изобретения редактор обеспечивается ингибитором урацилгликозилазы («UGI»). В некоторых вариантах осуществления редактор сливается с UGI. В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующая редактор, и мРНК, кодирующая UGI, совместно сформулированы в композиции LNP. В других вариантах осуществления редактор и UGI представлены в отдельных композициях LNP.

РНК-направляемый агент для разрезания ДНК может содержать по меньшей мере один домен, который взаимодействует с гидовой РНК («гРНК»). Кроме того, он может быть направлен на целевую последовательность с помощью гРНК. В системах нуклеаз Cas

класса 2 гРНК взаимодействует с нуклеазой, а также с целевой последовательностью, так что она направляет связывание с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления гРНК обеспечивает специфичность для направленного расщепления, и нуклеаза может быть универсальной и в паре с разными гРНК расщеплять разные целевые последовательности. Нуклеаза Cas класса 2 может соединяться с каркасной структурой гРНК типов, ортологов и типовых видов, перечисленных выше.

Как используется в данном документе, термин «рибонуклеопротеин» (РНП) или «комплекс РНП» относится к гРНК вместе с РНК-направляемым агентом для разрезания ДНК, таким как нуклеаза Cas, например, клеваза Cas, никаза Cas или агент для разрезания ДНК dCas, такой как белок слияния dCas9 (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления гРНК направляет РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, такой как Cas9, в целевую последовательность, и гРНК гибридизируется с целевой последовательностью и связывается с ней; в случаях, если агент представляет собой клевазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или никование.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения груз для композиции LNP включает по меньшей мере одну гРНК, содержащую гидовую последовательность, которая направляет РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, который может представлять собой нуклеазу (например, нуклеазу Cas, такую как Cas9), к целевой ДНК. гРНК может направлять нуклеазу Cas или нуклеазу Cas класса 2 к целевой последовательности в целевой молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гРНК связывается и обеспечивает специфичность расщепления нуклеазой Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления гРНК и нуклеаза Cas могут образовывать рибонуклеопротеид (РНП), *например*, комплекс CRISPR/Cas, в частности, комплекс CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas9 типа II. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas типа V, такой как комплекс Spf1/гРНК. Нуклеазы Cas и родственные гРНК могут быть спарены. Структуры каркаса гРНК, которые соединяются с каждой нуклеазой Cas класса 2, различаются в зависимости от конкретной системы CRISPR/Cas.

«Гидовая РНК», «гРНК» и просто «гидовая» применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения родственной гидовой нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого агента для разрезания ДНК. Направляющие РНК могут включать модифицированные РНК, как описано в данном документе. гРНК может быть или сгРНК (также известной как CRISPR РНК), или комбинацией сгРНК и тгРНК (также известной как тгасгРНК). сгРНК и тгРНК могут быть связаны в виде одиночной молекулы РНК (одиночная гидовая РНК, огРНК), или в виде двух отдельных молекул РНК (двойная гидовая РНК, дгРНК), необязательно ковалентно связаны. Термин «гидовая РНК» или «гРНК» относится к каждому типу. тгРНК может быть природной последовательностью или последовательностью тгРНК с модификациями или вариациями по сравнению с природными последовательностями.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующая РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, составлена в первой композиции LNP, а нуклеиновая кислота гРНК составлена во второй композиции LNP. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая сборные композиции липид-нуклеиновая кислота вводятся одновременно. В других вариантах осуществления первая и вторая сборные композиции липид-нуклеиновая кислота вводятся последовательно. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая сборные композиции липид-нуклеиновая кислота объединяются перед стадией преинкубации. В других вариантах осуществления первая и вторая сборные композиции липид-нуклеиновая кислота объединяются отдельно.

В определенных вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, включают модифицированную РНК. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, включают нуклеиновую кислоту с гидовой РНК. В определенных вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, включают гРНК, такую как дгРНК или модифицированная гРНК. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, композиции дополнительно содержат нуклеиновую кислоту гРНК, в частности гРНК. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, включают РНК-направляемый агент для разрезания ДНК и гРНК. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, включают мРНК нуклеазы Cas и гРНК, такую как мРНК нуклеазы Cas класса 2 и гРНК.

В некоторых вариантах осуществления груз может содержать молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую crРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая crРНК, содержит нацеливающую последовательность, фланкированную всей или частью повторяющейся последовательности из природной системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеотидную последовательность, кодирующую tracr РНК. В некоторых вариантах осуществления crРНК и tracr РНК могут кодироваться двумя отдельными нуклеиновыми кислотами. В других вариантах осуществления crРНК и tracr РНК могут кодироваться одной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления crРНК и tracr РНК могут кодироваться противоположными нитями одной нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления crРНК и tracrРНК могут кодироваться одной и той же цепью одной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК кодирует ogРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК кодирует ogРНК нуклеазы Cas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК кодирует ogРНК нуклеазы Cpf1.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с по меньшей мере одной транскрипционной или регуляторной

контрольной последовательностью, такой как промотор 3' UTR, или 5' UTR. В одном примере промотор может представлять собой промотор тРНК, *например*, тРНК^{Lys3} или химеру тРНК. См., Mefferd et al., *PHK*. 2015 21:1683-9; Scherer et al., *Nucleic Acids Res.* 2007 35: 2620-2628. В некоторых вариантах осуществления промотор может распознаваться РНК-полимеразой III (Pol III). Неограничивающие примеры промоторов Pol III также включают промоторы U6 и H1. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с промотором U6 мыши или человека. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК представляет собой модифицированную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК содержит модифицированный нуклеозид или нуклеотид. В некоторых вариантах нуклеиновая кислота гРНК содержит 5'-концевую модификацию, *например*, модифицированный нуклеозид или нуклеотид для стабилизации и предотвращения интеграции нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК содержит двухцепочечную ДНК, имеющую 5'-концевую модификацию на каждой цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК содержит в качестве 5'-концевой модификации инвертированный дидезокси-Т или инвертированный нуклеозид с удаленным азотистым основанием или нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК содержит метку, такую как биотин, дестибиотин-ТЕГ, дигоксигенин и флуоресцентные маркеры, включая, *например*, FAM, ROX, TAMRA и AlexaFluor.

Как используется в данном документе, термин «гидовая последовательность» относится к последовательности в гРНК, которая является комплементарной целевой последовательности и функционирует для направления гРНК к целевой последовательности для связывания или модификации (*например*, расщепления) посредством РНК-направляемого агента для разрезания ДНК. «Гидовая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Гидовая последовательность может иметь длину 20 пар оснований, *например*, в случае *Streptococcus pyogenes* (*m. e.* Spy Cas9) и родственных гомологов/ортологов Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут быть применены в качестве гидов, *например*, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность находится в гене или на хромосоме, *например*, и является комплементарной гидовой последовательности. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или идентичности между гидовой последовательностью и ее соответствующей целевой последовательностью может составлять около или по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными в области по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов. В других вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая

область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, гидовая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадений, причем гидовая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем гидовая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления несколько композиций LNP могут применяться совместно и/или по отдельности. В некоторых вариантах осуществления клетка может контактировать с первой и второй композициями LNP, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления каждая из первой и второй композиций LNP независимо содержит одну или более из мРНК, гРНК и нуклеиновой кислоты гРНК, например. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая композиции LNP вводятся одновременно. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая композиции LNP вводятся последовательно.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ множественного редактирования генома клетки (иногда упоминаемый в данном документе и других источниках как «мультиплексирование», «мультиплексное редактирование генов» или «мультиплексное редактирование генома»). Возможность инженерии множества признаков в одной клетке зависит от способности эффективно осуществлять редактирование нескольких целевых генов, включая нокауты и вставки в локусы, сохраняя при этом жизнеспособность и желаемый фенотип клетки. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки *in vitro*, приведение в контакт клетки с двумя или более сборными композициями липид-нуклеиновая кислота, где каждая сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит инструмент для редактирования генома нуклеиновой кислоты, способный редактировать целевой сайт, и расширение клетки *in vitro*. В результате применения указанного способа получается клетка, имеющая более одной геномной правки, причем геномные правки различаются. В определенных вариантах осуществления первая композиция LNP содержит первую гРНК, а вторая композиция LNP содержит вторую гРНК, при этом первая и вторая гРНК содержат разные гидовые последовательности, комплементарные разным мишеням. В таких вариантах осуществления с помощью композиций LNP можно осуществлять мультиплексное редактирование генов.

Целевые последовательности для РНК-направляемых белков для разрезания ДНК, таких как белки Cas, включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (*m. e.* заданная последовательность и ее обратное дополнение), поскольку субстрат нуклеиновой кислоты для белка Cas представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Соответственно, если указано, что гидовая последовательность является

«комплементарной целевой последовательности», следует понимать, что гидовая последовательность может направлять гРНК для связывания с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, если гидовая последовательность связывается с обратным комплементом целевой последовательности, гидовая последовательность является идентичной определенным нуклеотидам целевой последовательности (*например*, целевой последовательности, не включающей PAM) за исключением замены U на T в гидовой последовательности.

Длина целевой последовательности может зависеть от системы CRISPR/Cas и применяемых компонентов. Например, различные нуклеазы Cas класса 2 из различных видов бактерий имеют различные оптимальные длины нацеливающей последовательности. Соответственно, нацеливающая последовательность может содержать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50 нуклеотидов в длине. В некоторых вариантах осуществления длина нацеливающей последовательности на 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов длиннее или короче, чем гидовая последовательность встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. В определенных вариантах осуществления каркас нуклеазы Cas и гРНК будет происходить из одной и той же системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 18-24 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 19-21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления огРНК представляет собой «огРНК Cas9», способную опосредовать РНК-направляемое расщепление ДНК посредством белка Cas9. В некоторых вариантах осуществления огРНК представляет собой «Cpf1 огРНК», способную опосредовать РНК-направленное расщепление ДНК белком Cpf1. В определенных вариантах осуществления гРНК содержит сгРНК и трасгРНК, достаточные для образования активного комплекса с белком Cas9 и опосредования РНК-направляемого расщепления ДНК. В определенных вариантах осуществления гРНК содержит сгРНК, достаточную для образования активного комплекса с белком Cpf1 и опосредования РНК-направляемого расщепления ДНК. См. Zetsche 2015.

Определенные варианты осуществления также обеспечивают нуклеиновые кислоты, *например*, кассеты экспрессии, кодирующие описанную в данном документе гРНК. «Нуклеиновая кислота с гидовой РНК» применяется в данном документе для обозначения гРНК (*например*, огРНК или дгРНК) и кассеты экспрессии гРНК, которая представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более гРНК.

Модифицированные РНК

В определенных вариантах осуществления липидные композиции, такие как композиции LNP, содержат модифицированные нуклеиновые кислоты, в том числе модифицированные РНК.

Модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды могут присутствовать в РНК, например гРНК или мРНК. гРНК или мРНК, содержащая один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, например, называется «модифицированной» РНК для описания присутствия одного или более неприродных и/или природных компонентов или конфигураций, которые применяются вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, C и U. В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК синтезируется с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, называемым в данном документе «модифицированным».

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать один или более из: (i) изменения, *например*, замены одного или обоих не связывающих фосфатных атомов кислорода и/или одного или более связывающих фосфатных атомов кислорода в сложной фосфодиэфирной связи основа (типичная модификация остова); (ii) изменения, *например*, замены составляющего рибозного сахара, *например*, 2'-гидроксила на рибозном сахаре (типичная модификация сахара); (iii) полной замены фосфатного фрагмента «дефосфо» линкерами (типичная модификация основной цепи); (iv) модификации или замены природного нуклеинового основания, в том числе неканоническим нуклеиновым основанием (типичная модификация основания); (v) замены или модификации рибозофосфатного остова (типичная модификация остова); (vi) модификации 3'-конца или 5'-конца полинуклеотида, *например*, удаления, модификации или замены концевой фосфатной группы или конъюгации фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3'-или 5'-кэпа могут включать в себя модификацию сахара и/или остова); и (vii) модификации или замены сахара (типичная модификация сахара). Определенные варианты осуществления содержат модификацию на 5'-конце мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Определенные варианты осуществления содержат модификацию мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Определенные варианты осуществления содержат модификацию на 3-конце мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Модифицированная РНК может содержать модификации на 5'-конце и 3'-конце. Модифицированная РНК может содержать один или более модифицированных остатков в неконцевых положениях. В определенных вариантах осуществления гРНК включает по меньшей мере один остаток. В определенных вариантах осуществления мРНК включает по меньшей мере один остаток. В определенных вариантах осуществления модифицированная гРНК содержит модификацию одного или большего количества первых пяти нуклеотидов на 5' конце. В определенных вариантах осуществления модифицированная гРНК содержит модификацию одного или большего количества первых пяти нуклеотидов на 5' конце. Композиция LNP по п. 52 или п. 53, где модифицированная гРНК содержит модификацию в одном или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце.

Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены распаду, *например*, внутриклеточными нуклеазами или нуклеазами, обнаруженными в сыворотке. Например, нуклеазы могут гидролизовать сложные фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Соответственно, в одном аспекте РНК (например, мРНК, гРНК), описанные в

данном документе, могут содержать один или большее количество модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, *например*, для придания стабильности внутриклеточным или сывороточным нуклеазам. В некоторых вариантах осуществления модифицированные молекулы РНК, описанные в данном документе, могут вызывать пониженный врожденный иммунный ответ при введении в популяцию клеток как *in vivo*, так и *ex vivo*. Термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, особенно интерферонов, и гибель клеток.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления РНК или нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну модификацию, которая придает усиленную или повышенную стабильность нуклеиновой кислоте, включая, например, повышенную устойчивость к расщеплению нуклеазами *in vivo*. В контексте данного документа термины «модификация» и «модифицированный», поскольку такие термины относятся к нуклеиновым кислотам, представленным в данном документе, включают по меньшей мере одно изменение, которое предпочтительно увеличивает стабильность и делает РНК или нуклеиновую кислоту более стабильной (например, устойчивой к расщеплению нуклеазами), по сравнению с версией РНК или нуклеиновой кислоты дикого типа или природного происхождения. В контексте данного документа термины «стабильный» и «стабильность», как таковые, относятся к нуклеиновым кислотам, описанным в данном документе, и, в частности, в отношении РНК, относятся к усиленной или повышенной устойчивости к разрушению, например, нуклеаз (т. е. эндонуклеаз или экзонуклеаз), которые обычно способны разрушать такую РНК. Повышенная стабильность может включать, например, меньшую чувствительность к гидролизу или другому разрушению эндогенными ферментами (например, эндонуклеазами или экзонуклеазами) или условиями внутри клетки или ткани-мишени, тем самым увеличивая или усиливая пребывание такой РНК или нуклеиновой кислоты в клетке-мишени, ткани, субъекте и/или цитоплазме. Стабилизированные молекулы РНК или нуклеиновых кислот, представленные в данном документе, демонстрируют более длительный период полураспада по сравнению с их природными немодифицированными аналогами (например, молекулами дикого типа). Также под терминами «модификация» и «модифицированный» подразумеваются термины, относящиеся к мРНК композиций LNP, описанных в данном документе, и изменения, которые улучшают или усиливают трансляцию нуклеиновых кислот мРНК, включая, например, включение последовательностей, которые действуют в инициации трансляции белка (например, консенсусная последовательность Козака). (Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20): 8125-48 (1987)).

В некоторых вариантах осуществления РНК или нуклеиновая кислота подвергаются химической или биологической модификации для придания им большей стабильности. Типовые примеры модификаций РНК или нуклеиновой кислоты включают

вытеснение основания (например, путем делеции или замены одного нуклеотида на другой) или модификацию основания, например, химическую модификацию основания. Фраза «химические модификации», используемая в данном документе, включает модификации, которые вводят химические свойства, отличающиеся от тех, которые наблюдаются в РНК или нуклеиновых кислотах природного происхождения, например, ковалентные модификации, такие как введение модифицированных нуклеотидов (например, аналогов нуклеотидов или включение подвесных групп, которые в природе не встречаются в РНК, таких как дезоксинуклеозид, или молекул нуклеиновых кислот).

В некоторых вариантах осуществления модификации остова, фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или более атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, *например*, модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать полную замену немодифицированной фосфатной группы модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модификация остова фосфатной цепи может включать изменения, которые приводят или к незаряженному линкеру, или к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные фосфатные эфиры борана, гидрофосфонаты, фосфороамидаты, алкильные или арильные фосфонаты и сложные фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замена одного из мостиковых атомов кислорода одним из вышеуказанных атомов или групп атомов может сделать атом фосфора хиральным. Стереогенный атом фосфора может иметь конфигурацию «R» (в данном случае Rp) или конфигурацию «S» (в данном случае Sp). Остов также можно модифицировать путем замены мостикового кислорода (*т. е.* кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) азотом (мостиковые фосфороамидаты), серой (мостиковые фосфоротиоаты) и углеродом (мостиковые метиленфосфонаты). Замена может происходить или в линкерном кислороде, или в обоих линкерных кислородах. В некоторых модификациях остова фосфатная группа может быть заменена линкерами, не содержащими фосфор. В некоторых вариантах осуществления заряженная фосфатная группа может быть заменена нейтральным фрагментом. Примеры фрагментов, которые могут заменить фосфатную группу, могут включать без ограничения, *например*, метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиозфир, этиленоксидный линкер, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленимимино, метиленингидразо, метиленидиметилгидразо и метилениоксиметилимино.

В некоторых вариантах осуществления композиция или состав, раскрытые в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), такую как, *например*, ORF, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, нуклеазу Cas или нуклеазу Cas класса 2, как описано в данном документе. В

некоторых вариантах осуществления предоставляется, используется или вводится мРНК, содержащая ORF, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas или нуклеаза Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления ORF является кодон-оптимизированным. В некоторых вариантах осуществления ORF, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой «модифицированную ORF РНК-направляемого ДНК-связывающего агента» или просто «модифицированную ORF», которые используются для краткого обозначения того, что ORF модифицирована одним или более из следующих способов: (1) модифицированная ORF имеет содержание уридина в диапазоне от минимального содержания уридина до 150% от минимального содержания уридина; (2) модифицированная ORF имеет содержание уридинового динуклеотида в диапазоне от минимального содержания уридинового динуклеотида до 150% от минимального содержания уридинового динуклеотида; (3) модифицированная ORF состоит из набора кодонов, из которых по меньшей мере 75% кодонов являются кодоном(ами) с минимальным содержанием уридинов для данной аминокислоты, *например*, кодоном(ами) с наименьшим количеством уридинов (обычно 0 или 1, за исключением кодона для фенилаланина, причем этот кодон с минимальным содержанием уридинов имеет 2 уридина); или (4) модифицированная ORF содержит по меньшей мере один модифицированный уридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированная ORF модифицируется по меньшей мере двумя, тремя или четырьмя из вышеуказанных способов. В некоторых вариантах осуществления модифицированная ORF содержит по меньшей мере один модифицированный уридин и модифицирована по меньшей мере одним, двумя, тремя или всеми способами из (1)-(3), описанными выше.

«Модифицированный уридин» используется в данном документе для обозначения нуклеозида, отличного от тимидина, с теми же акцепторами водородных связей, что и уридин, и одним или более структурными отличиями от уридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой замещенный уридин, *т. е.* уридин, в котором один или более протонных заместителей (*например*, алкокси, такой как метокси) занимает место протона. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой замещенный псевдоуридин, *т. е.* псевдоуридин, в котором один или более протонных заместителей (*например*, алкил, такой как метил) занимает место протона. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой любой из замещенного уридина, псевдоуридина или замещенного псевдоуридина.

В контексте данного документа «положение уридина» относится к положению в полинуклеотиде, занимаемом уридином или модифицированным уридином. Так, например, полинуклеотид, в котором «100% положений уридина представляют собой модифицированные уридины», содержит модифицированный уридин в каждом положении, которое было бы уридином в обычной РНК (где все основания являются

стандартными основаниями А, U, С или G) той же последовательности. Если не указано иное, U в полинуклеотидной последовательности таблицы последовательностей или в перечне последовательностей, включенном или сопровождающем данное описание, может представлять собой уридин или модифицированный уридин.

Кодоны с минимальным содержанием уридина

	Аминокислота	Кодон с минимальным содержанием уридина
A	Аланин	GCA, или GCC, или GCG
G	Глицин	GGA, или GGC, или GGG
V	Валин	GUC, или GUA, или GUG
D	Аспарагиновая кислота	GAC
E	Глутаминовая кислота	GAA или GAG
I	Изолейцин	AUC, или AUA, или AUG
T	Треонин	ACA, или ACC, или ACG
N	Аспарагин	AAC
K	Лизин	AAG или AAA
S	Серин	AGC
R	Аргинин	AGA или AGG
L	Лейцин	CUG, или CUA, или CUC
P	Пролин	CCG, или CCA, или CCC
H	Гистидин	CAC, или CAA, или CAG
Q	Глутамин	CAG или CAA
F	Фенилаланин	UUC
Y	Тирозин	UAC
C	Цистеин	UGC
W	Триптофан	UGG
M	Метионин	AUG

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления модифицированная ORF может состоять из набора кодонов, из которых по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% кодонов являются кодонами, перечисленными в таблице кодонов с минимальным содержанием уридина выше.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления модифицированная ORF может иметь содержание уридина в диапазоне от его минимального содержания уридина до 150%, 145%, 140%, 135%, 130%, 125%, 120%, 115%, 110%, 105%, 104%, 103%, 102% или 101% от минимального содержания уридина.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления модифицированная ORF

может иметь содержание динуклеотида из уридинов в диапазоне от ее минимального содержания динуклеотида из уридинов до 150%, 145%, 140%, 135%, 130%, 125%, 120%, 115%, 110%, 105%, 104%, 103%, 102% или 101% от минимального содержания динуклеотида из уридинов.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления модифицированная ORF может содержать модифицированный уридин по меньшей мере в одном, множестве или во всех положениях уридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой уридин, модифицированный в положении 5, *например*, галогеном, метилом или этилом. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин, модифицированный в положении 1, *например*, галогеном, метилом или этилом. Модифицированный уридин может представлять собой, *например*, псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин, 5-метоксиуридин, 5-йодоуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-йодоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и N1-метилпсевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию N1-метилпсевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодоуридина и N1-метилпсевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодоуридина и 5-метоксиуридина.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% положений уридина в мРНК согласно настоящему изобретению представляют собой модифицированные уридины. В некоторых вариантах осуществления 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно настоящему изобретению представляют собой модифицированные уридины, *например*, 5-метоксиуридин, 5-йодоуридин, N1-метилпсевдоуридин, псевдоуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно настоящему изобретению представляют собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления 10%-25%,

15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно настоящему изобретению представляют собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно настоящему изобретению представляют собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно настоящему изобретению представляют собой 5-йодуридин. В некоторых вариантах осуществления 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно настоящему изобретению представляют собой 5-метоксиуридин, а остальные представляют собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно настоящему изобретению представляют собой 5-метоксиуридин, а остальные представляют собой N1-метилпсевдоуридин.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления модифицированная ORF может иметь пониженное содержание динуклеотида из уридинов, такое как минимально возможное содержание динуклеотида из уридинов (UU), *например*, ORF, в которой (а) используется кодон с минимальным содержанием уридина (как обсуждалось выше) в каждом положении и (b) кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и данная ORF. Содержание динуклеотида из уридинов (UU) может быть выражено в абсолютных единицах в виде перечня динуклеотидов UU в ORF или на основе частоты в виде процентной доли положений, занимаемых уридинами в динуклеотидах из уридинов (*например*, AUUAU будет иметь содержание динуклеотида из уридинов 40%, потому что 2 из 5 положений занимают уридины динуклеотида из уридинов). Модифицированные остатки уридина считаются эквивалентными уридинам с целью оценки минимального содержания динуклеотидов из уридина.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере одну UTR из экспрессируемой мРНК млекопитающего, такой как конститутивно экспрессируемой мРНК. мРНК считается конститутивно экспрессируемой у млекопитающего, если она непрерывно транскрибируется по меньшей мере в одной ткани здорового взрослого млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5' UTR, 3' UTR или 5' и 3' UTR из экспрессируемой РНК млекопитающего, такой как конститутивно экспрессируемой мРНК млекопитающего. мРНК актина представляет собой пример конститутивно экспрессируемой мРНК.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере одну UTR из 17-бета-гидроксистероида дегидрогеназы 4 (HSD17B4 или HSD), *например*, 5'-UTR из HSD. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере одну UTR из мРНК глобина, *например*, мРНК альфа-глобина человека (HBA), мРНК бета-глобина человека (HBB) или мРНК бета-глобина *Xenopus laevis* (XBG). В некоторых

вариантах осуществления мРНК содержит 5'-UTR, 3'-UTR или 5'- и 3'-UTR из мРНК глобина, таких как HBA, HBB или XBG. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'-UTR из бычьего гормона роста, цитомегаловируса (CMV), мышинового Hba-a1, HSD, гена альбумина, HBA, HBB или XBG. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-UTR из бычьего гормона роста, цитомегаловируса, мышинового Hba-a1, HSD, гена альбумина, HBA, HBB или XBG. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'- и 3'-UTR из бычьего гормона роста, цитомегаловируса, мышинового Hba-a1, HSD, гена альбумина, HBA, HBB, XBG, белка теплового шока 90 (Hsp90), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), бета-актина, альфа-тубулина, опухолевого белка (p53) или рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'- и 3'-UTR, которые происходят из одного и того же источника, *например*, конститутивно экспрессируемой мРНК, например, актина, альбумина или глобина, например, HBA, HBB или XBG.

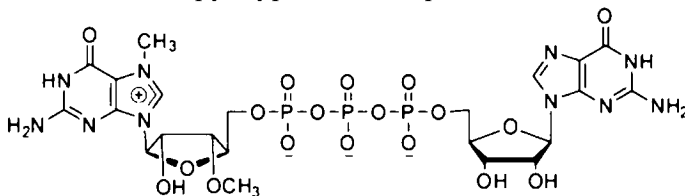
В некоторых вариантах осуществления мРНК не содержит 5'-UTR, *например*, нет никаких дополнительных нуклеотидов между 5'-кэпом и старт-кодоном. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит последовательность Козака (описанную ниже) между 5'-кэпом и старт-кодоном, но не имеет никакого дополнительного 5'-UTR. В некоторых вариантах осуществления мРНК не содержит 3'-UTR, *например*, нет никаких дополнительных нуклеотидов между стоп-кодоном и поли(А)хвостом.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит последовательность Козака. Последовательность Козака может влиять на инициацию трансляции и общий выход полипептида, транслированного с мРНК. Последовательность Козака содержит кодон метионина, который может функционировать в качестве старт-кодона. Минимальная последовательность Козака представляет собой NNNRUGN, где по меньшей мере одно из следующего является истинным: первый N представляет собой A или G, а второй N представляет собой G. В контексте нуклеотидной последовательности R означает пурин (A или G). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козака представляет собой RNNRUGN, NNNRUGG, RNNRUGG, RNNAUGN, NNNAUGG или RNNAUGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козака имеет вид gccRUGg с нулевым несовпадением или с одним или двумя несовпадениями с положениями в нижнем регистре. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козака имеет вид gccAUGg с нулевым несовпадением или с одним или двумя несовпадениями с положениями в нижнем регистре. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козака имеет вид gccRccAUGG с нулевым несовпадением или с одним, двумя или тремя несовпадениями с положениями в нижнем регистре. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козака имеет вид gccAccAUG с нулевым несовпадением или с одним, двумя, тремя или четырьмя несовпадениями с положениями в нижнем регистре. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козака представляет собой GCCACCAUG. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козака имеет вид

gscgscRccAUGG с нулевым несоответствием или с одним, двумя, тремя или четырьмя несоответствиями с положениями в нижнем регистре.

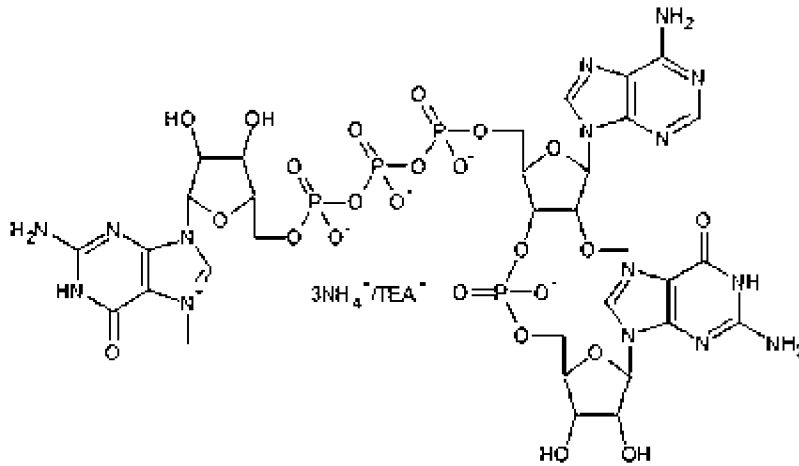
В некоторых вариантах осуществления мРНК, описанная в данном документе, содержит 5'-кэп, такой как кэп 0, кэп 1 или кэп 2. 5'-кэп, как правило, представляет собой 7-метилгуаниновый рибонуклеотид (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждается ниже, *например*, в отношении ARCA), связанный через 5'-трифосфат с положением 5' первого нуклеотида 5'-3' цепи мРНК, *т. е.* первого кэп-проксимального нуклеотида. В кэпе 0 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-гидроксил. В кэпе 1 рибозы первого и второго транскрибируемых нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси и 2'-гидроксил, соответственно. В кэпе 2 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси. См., *например*, Katibah et al. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas et al. (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115. Большинство эндогенных мРНК высших эукариот, включая мРНК млекопитающих, таких как мРНК человека, содержат кэп 1 или кэп 2. Кэп 0 и другие кэп-структуры, отличающиеся от кэпа 1 и кэпа 2, могут быть иммуногенными для млекопитающих, таких как люди, из-за распознавания как «чужие» компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может привести к повышенным уровням цитокинов, включая интерферон I типа. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5, могут также конкурировать с eIF4E за связывание мРНК с кэпом, отличным от кэпа 1 или кэпа 2, потенциально ингибируя трансляцию мРНК.

Кэп может быть включен во время транскрипции. Например, ARCA (аналог антиреверсивного колпачка; Thermo Fisher Scientific, кат. № AM8045) представляет собой аналог кэпа, содержащий 7'-метилгуанин-3'-метокси-5'-трифосфат, связанный с положением 5' гуанинового рибонуклеотида, который может быть включен *in vitro* в транскрипт во время инициации. ARCA приводит к кэп-структуре кэп 0, в которой положение 2' первого кэп-проксимального нуклеотида представляет собой гидроксил. См., *например*, Stepinski et al., (2001) «Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG,», *RNA* 7: 1486-1495. Структура ARCA приведена ниже.



CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7113) или CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies Cat. No. N-7133) могут быть использованы для обеспечения структуры Cap1 ко-транскрипционно. 3'-О-метилованные версии CleanCap™ AG и CleanCap™ GG также доступны от TriLink Biotechnologies как. № N-7413 и N-7433, соответственно. Структура CleanCap™ AG

приведена ниже.



Альтернативно, кэп может быть добавлен к РНК после транскрипции. Например, коммерчески доступен кэпирующий фермент вируса осповакцины (New England Biolabs кат. № M2080S) и имеет активности РНК-трифосфатазы и гуанилилтрансферазы, обеспечиваемые его субъединицей D1, и гуанинметилтрансферазы, обеспечиваемой его субъединицей D12. Поэтому он может добавлять 7-метилгуанин к РНК, так что образуется кэп 0, в присутствии S-аденозилметионина и GTP. См., например, Guo, P. and Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479.

В некоторых вариантах осуществления мРНК дополнительно содержит полиадениловый поли(А)хвост. В некоторых вариантах осуществления поли(А)хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аденинов, необязательно до 300 аденинов. В некоторых вариантах осуществления поли(А)хвост содержит 95, 96, 97, 98, 99 или 100 адениновых нуклеотидов. В некоторых случаях поли(А)хвост «прерывается» одним или более неадениновыми нуклеотидными «якорями» в одном или более местах внутри поли(А)хвоста. Поли(А)хвосты могут содержать по меньшей мере 8 последовательных адениновых нуклеотидов, но также могут содержать один или более неадениновых нуклеотидов. Как используется в данном документе, термин «неадениновые нуклеотиды» относится к любым природным или не природным нуклеотидам, которые не содержат аденин. Гуаниновые, тиминового и цитозинового нуклеотиды являются примерами неадениновых нуклеотидов. Таким образом, поли(А)хвосты в мРНК, описанной в данном документе, могут содержать последовательные адениновые нуклеотиды, расположенные на 3'-конце по отношению к нуклеотидам, кодирующим РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или представляющую интерес последовательность. В некоторых случаях поли(А)хвосты на мРНК содержат не последовательные адениннуклеотиды, расположенные на 3'-конце по отношению к нуклеотидам, кодирующим РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или представляющую интерес последовательность, причем неадениновые нуклеотиды прерывают адениновые нуклеотиды с регулярными или нерегулярно расположенными интервалами.

Как используется в данном документе, термин «неадениновые нуклеотиды» относится к любым природным или неприродным нуклеотидам, которые не содержат аденин. Гуаниновые, тиминные и цитозинные нуклеотиды являются примерами неадениновых нуклеотидов. Таким образом, поли(А)хвосты в мРНК, описанной в данном документе, могут содержать последовательные адениновые нуклеотиды, расположенные на 3'-конце по отношению к нуклеотидам, кодирующим РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или представляющую интерес последовательность. В некоторых случаях поли(А)хвосты на мРНК содержат непоследовательные адениннуклеотиды, расположенные на 3'-конце по отношению к нуклеотидам, кодирующим РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или представляющую интерес последовательность, причем неадениновые нуклеотиды прерывают адениновые нуклеотиды с регулярными или нерегулярно расположенными интервалами.

В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают. В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают с использованием способа осаждения (*например*, осаждения LiCl, осаждения спиртом или эквивалентного способа, *например*, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают с использованием способа на основе хроматографии, такого как способ на основе ВЭЖХ, или эквивалентный способ (*например*, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают с использованием как способа осаждения (*например*, осаждения LiCl), так и способа на основе ВЭЖХ.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна гРНК предложена в комбинации с мРНК, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления гРНК предложена в виде молекулы, отдельной от мРНК. В некоторых вариантах осуществления гРНК предложена как часть, такая как часть UTR мРНК, описанной в данном документе.

мРНК

В некоторых вариантах осуществления композиция или состав, раскрытые в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую агент для разрезания ДНК, такой как РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, например, нуклеазу Cas или нуклеазу Cas класса 2, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предоставляется, используется или вводится мРНК, содержащая ORF, кодирующую РНК-направляемый агент для разрезания ДНК, такой как нуклеаза Cas или нуклеаза Cas класса 2. мРНК может содержать один или более из 5' кэпа, 5' нетранслируемой области (UTR), 3'-UTR и полиаденинового хвоста. мРНК может содержать модифицированную открытую рамку считывания, например, для кодирования последовательности ядерной локализации или для применения альтернативных кодонов для кодирования белка.

мРНК в описанных композициях LNP может кодировать, например, секретлируемый гормон, фермент, рецептор, полипептид, пептид или другой представляющий интерес белок, который обычно секретруется. В некоторых вариантах

осуществления мРНК может необязательно иметь химические или биологические модификации, которые, например, улучшают стабильность и/или период полураспада такой мРНК или которые улучшают или иным образом облегчают выработку белка.

Кроме того, подходящие модификации включают изменения в одном или более нуклеотидах кодона, так что кодон кодирует ту же аминокислоту, но является более стабильным, чем кодон, обнаруженный в версии мРНК дикого типа. Например, была продемонстрирована обратная зависимость между стабильностью РНК и более высоким числом остатков цитидинов (С') и/или уридинов (U'), а также было обнаружено, что РНК, лишенная остатков С и U, устойчива к большинству РНАз (Heidenreich, et al., J. Biol Chem. 269, 2131-8 (1994)). В некоторых вариантах осуществления количество остатков С и/или U в последовательности мРНК снижено. В другом варианте количество остатков С и/или U снижается путем замены одного кодона, кодирующего конкретную аминокислоту, на другой кодон, кодирующий ту же или родственную аминокислоту. Предполагаемые модификации нуклеиновых кислот мРНК также включают введение псевдоуридинов. Включение псевдоуридинов в нуклеиновые кислоты мРНК может повысить стабильность и трансляционную способность, а также снизить иммуногенность *in vivo*. См., например, Karikó, K., et al., Molecular Therapy 16 (11): 1833-1840 (2008). Замены и модификации мРНК могут быть выполнены способами, хорошо известными специалисту или рядовому специалисту в данной области.

Ограничения на уменьшение количества остатков С и U в последовательности, вероятно, будут больше в кодирующей области мРНК по сравнению с нетранслируемой областью (т. е. вероятно будет невозможно удалить все остатки С и U, присутствующие в сообщении, сохраняя при этом способность сообщения кодировать желаемую аминокислотную последовательность). Однако вырожденность генетического кода дает возможность снизить количество остатков С и/или U, присутствующих в последовательности, при сохранении той же кодирующей способности (т. е. в зависимости от того, какая аминокислота кодируется кодоном, может быть несколько различных возможностей для модификации последовательностей РНК).

Термин модификация также включает, например, включение ненуклеотидных связей или модифицированных нуклеотидов в последовательности мРНК (например, модификации одного или обоих 3' и 5' концов молекулы мРНК, кодирующей функционально секретлируемый белок или фермент). Такие модификации включают добавление оснований в последовательность мРНК (например, включение поли(А)хвоста или более длинного поли(А)хвоста), изменение 3'-UTR или 5'-UTR, комплексообразование мРНК с агентом (например, белком или комплементарной молекулой нуклеиновой кислоты), а также включение элементов, которые изменяют структуру молекулы мРНК (например, образуют вторичные структуры).

Считается, что поли(А)хвост стабилизирует естественных посланников. Следовательно, длинный поли(А)хвост может быть добавлен к молекуле мРНК, что делает мРНК более стабильной. Поли(А)хвосты могут быть добавлены с использованием

множества технических приемов, признанных в данной области техники. Например, длинные поли(А)хвосты могут быть добавлены к синтетической или транскрибируемой *in vitro* мРНК с использованием поли(А)полимеразы (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Вектор транскрипции также может кодировать длинные поли(А)хвосты. Кроме того, поли(А)хвосты могут быть добавлены путем транскрипции непосредственно из продуктов ПЦР. В некоторых вариантах осуществления длина поли(А)хвоста составляет по меньшей мере около 90, 200, 300, 400, по меньшей мере 500 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длину поли(А)хвоста регулируют для контроля стабильности модифицированной молекулы мРНК и, таким образом, транскрипции белка. Например, поскольку длина поли(А)хвоста может влиять на период полураспада молекулы мРНК, длину поли(А)хвоста можно отрегулировать, чтобы изменить уровень устойчивости мРНК к нуклеазам и, таким образом, контролировать динамику экспрессии белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления стабилизированные молекулы мРНК являются достаточно устойчивыми к разрушению *in vivo* (например, нуклеазами), так что они могут быть доставлены в клетку-мишень без носителя для переноса.

В определенных вариантах осуществления мРНК может быть модифицирована путем включения 3'- и/или 5'-нетранслируемых (UTR) последовательностей, не встречающихся в природе в мРНК дикого типа. В некоторых вариантах осуществления 3'- и/или 5'-фланкирующая последовательность, которая естественным образом фланкирует мРНК и кодирует второй неродственный белок, может быть включена в нуклеотидную последовательность молекулы мРНК, кодирующей терапевтический или функциональный белок, для ее модификации. Например, 3'- или 5'-последовательности из молекул мРНК, которые являются стабильными (например, глобин, актин, GAPDH, тубулин, гистон или ферменты цикла лимонной кислоты), могут быть включены в 3'- и/или 5'-область молекулы нуклеиновой кислоты смысловой мРНК для увеличения стабильности молекулы смысловой мРНК. См., например, заявку на патент США №2003/0083272.

Более подробные описания модификаций мРНК можно найти в заявке на патент США №2017/0210698A1 на страницах 57-68, содержания которых включены в данный документ.

Матричная нуклеиновая кислота

Способы, раскрытые в данном документе, могут включать матричную нуклеиновую кислоту. Матрицу можно применять для изменения или вставки последовательности нуклеиновой кислоты у целевого сайта или около него для РНК-направляемого белка для разрезания ДНК, такого как нуклеаза Cas, например, нуклеаза Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение матрицы в клетку. В некоторых вариантах осуществления может быть предложена одна матрица. В других вариантах осуществления могут быть предложены две или более матриц, так что редактирование может происходить на двух или более целевых сайтах. Например, могут быть предложены разные матрицы для редактирования одного гена в

клетке или двух разных генов в клетке.

В некоторых вариантах осуществления матрица может использоваться в гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления гомологичная рекомбинация может приводить к интеграции последовательности матрицы или части последовательности матрицы в молекулу целевой нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления матрица может быть использована в направляемой гомологией репарации, которая включает внедрение цепи ДНК в сайт расщепления в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления направляемая гомологией репарация может привести к включению последовательности матрицы в отредактированную молекулу целевой нуклеиновой кислоты. В еще других вариантах осуществления матрица может использоваться при редактировании генов, опосредованном негомологичным соединением концов. В некоторых вариантах осуществления последовательность матрицы не имеет сходства с последовательностью нуклеиновой кислоты вблизи сайта расщепления. В некоторых вариантах осуществления включены матрица или часть последовательности матрицы. В некоторых вариантах осуществления матрица содержит фланкирующие последовательности инвертированных концевых повторов (ITR).

В некоторых вариантах осуществления матрица может содержать первое плечо гомологии и второе плечо гомологии (также называемые первой и второй нуклеотидной последовательностью), которые комплементарны последовательностям, расположенным выше и ниже от сайта расщепления, соответственно. Если матрица содержит два плеча гомологии, каждое плечо может иметь одинаковую длину или разные длины, и последовательность между плечами гомологии может быть практически аналогичной или идентичной целевой последовательности между плечами гомологии, или она может быть совершенно не связана. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или процент идентичности между первой нуклеотидной последовательностью на матрице и последовательностью выше от сайта расщепления и между второй нуклеотидной последовательностью на матрице и последовательностью ниже от сайта расщепления может обеспечить гомологичную рекомбинацию, такую как, например, гомологичная рекомбинация высокой точности между матрицей и молекулой целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности может составлять около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности может составлять около 95%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности может составлять по меньшей мере 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности может составлять 100%. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности может составлять около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности может составлять около 95%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности может составлять по меньшей мере 98%, 99% или 100%. В

некоторых вариантах осуществления процент идентичности может составлять 100%.

В некоторых вариантах осуществления последовательность матрицы может соответствовать, содержать или состоять из эндогенной последовательности целевой клетки. Она может также или альтернативно соответствовать, содержать или состоять из экзогенной последовательности целевой клетки. Используемый в данном документе термин «эндогенная последовательность» относится к последовательности, которая является нативной для клетки. Термин «экзогенная последовательность» относится к последовательности, которая не является нативной для клетки, или к последовательности, чье нативное расположение в геноме клетки находится в другом месте. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой геномную последовательность клетки. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой хромосомную или внехромосомную последовательность. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой плазмидную последовательность клетки. В некоторых вариантах осуществления последовательность матрицы может быть по существу идентичной части эндогенной последовательности в клетке в или около сайта расщепления, но содержать по меньшей мере одно нуклеотидное изменение. В некоторых вариантах осуществления редактирование расщепленной молекулы целевой нуклеиновой кислоты с помощью матрицы может привести к мутации, включающей вставку, делецию или замену одного или более нуклеотидов молекулы целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к одному или более аминокислотным изменениям в белке, экспрессируемом геном, содержащим целевую последовательность.

В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к одному или более нуклеотидным изменениям в РНК, экспрессируемой целевым сайтом вставки. В некоторых вариантах осуществления мутация может изменять уровень экспрессии целевого гена. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к повышенной или пониженной экспрессии целевого гена. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к нокауту гена. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к нокауту гена. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к восстановлению функции гена. В некоторых вариантах осуществления редактирование расщепленной молекулы целевой нуклеиновой кислоты с помощью матрицы может приводить к изменению последовательности экзона, последовательности интрона, регуляторной последовательности, транскрипционной контрольной последовательности, трансляционной контрольной последовательности, сайта сплайсинга или некодирующей последовательности молекулы целевой нуклеиновой кислоты, такой как ДНК.

В других вариантах осуществления последовательность матрицы может содержать экзогенную последовательность. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность может содержать кодирующую последовательность. В некоторых

вариантах осуществления экзогенная последовательность может содержать кодирующую последовательность белка или РНК (например, ORF), функционально связанную с экзогенной промоторной последовательностью, так что при интеграции экзогенной последовательности в молекулу целевой нуклеиновой кислоты клетка способна экспрессировать белок или РНК, кодируемую интегрированной последовательностью. В других вариантах осуществления после интеграции экзогенной последовательности в молекулу целевой нуклеиновой кислоты экспрессия интегрированной последовательности может регулироваться эндогенной промоторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность может обеспечивать последовательность кДНК, кодирующую белок или часть белка. В еще других вариантах осуществления экзогенная последовательность может содержать или состоять из последовательности экзона, последовательности интрона, регуляторной последовательности, транскрипционной регуляторной последовательности, трансляционной регуляторной последовательности, сайта сплайсинга или некодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления интеграция экзогенной последовательности может привести к восстановлению функции гена. В некоторых вариантах осуществления интеграция экзогенной последовательности может привести к нокину гена. В некоторых вариантах осуществления интеграция экзогенной последовательности может привести к нокауту гена.

Матрица может быть любой подходящей длины. В некоторых вариантах осуществления матрица может содержать 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000 или более нуклеотидов в длину. Матрица может представлять собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту. Матрица может представлять собой двухцепочечную или частично двухцепочечную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления длина одноцепочечной матрицы составляет 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления матрица может содержать нуклеотидную последовательность, которая комплементарна части молекулы целевой нуклеиновой кислоты, содержащей целевую последовательность (то есть «плечо гомологии»). В некоторых вариантах осуществления матрица может содержать плечо гомологии, которое комплементарно последовательности, расположенной выше или ниже от сайта расщепления на молекуле целевой нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления матрица содержит оцДНК или дцДНК, содержащие фланкирующие последовательности инвертированных концевых повторов (ITR). В некоторых вариантах осуществления матрица предложена в виде вектора, плазмиды, миникольца, нанокольца или продукта ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту очищают. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту очищают с использованием способа осаждения (*например*, осаждения LiCl, осаждения спиртом или эквивалентного способа, *например*, как описано в данном документе). В некоторых вариантах

осуществления нуклеиновую кислоту очищают с использованием способа на основе хроматографии, такого как способ на основе ВЭЖХ, или эквивалентный способ (*например*, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту очищают с использованием как способа осаждения (*например*, осаждения LiCl), так и способа на основе ВЭЖХ. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту очищают фильтрованием в тангенциальном потоке (TFF).

Типы клетки

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку, такую как клетка человека у субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку *in vivo*, например, в ткани, органе или организме. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку. Как используется в данном описании, термин «иммунная клетка» относится к клетке иммунной системы, включая, *например*, лимфоцит (*например*, Т-клетку, В-клетку, естественную киллерную клетку («NK-клетку» и НКТ-клетку или iNKТ-клетку)), моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит (*например*, нейтрофил, эозинофил и базофил). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы может быть выбрана из CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клеток, регуляторных Т-клеток (Treg), В-клеток, NK-клеток и дендритных клеток (DC). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой адаптивную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой В-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой NK-клетку.

Как используется в данном документе, Т-клетка может быть определена как клетка, которая экспрессирует Т-клеточный рецептор («TCR» или « $\alpha\beta$ TCR» или « $\gamma\delta$ TCR»), однако в некоторых вариантах осуществления TCR Т-клетки может быть генетически модифицирован для снижения его экспрессии (*например*, путем генетической модификации генов TRAC или TRBC), поэтому экспрессию белка CD3 можно применять в качестве маркера для идентификации Т-клетки согласно стандартным методам проточной цитометрии. CD3 представляет собой многосубъединичный сигнальный комплекс, связанный с TCR. Таким образом, Т-клетка может быть названа как CD3+. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой клетку, которая экспрессирует маркер CD3+ и либо маркер CD4+, либо маркер CD8+.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD8 и, таким образом, CD8+ согласно стандартным методам проточной цитометрии может называться «цитотоксичной» Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD4 и, таким образом, CD4+ согласно стандартным

способам проточной цитометрии может называться «вспомогательной» Т-клеткой. CD4+ Т-клетки могут дифференцироваться в подмножества и могут называться Th1 клетками, Th2 клетками, Th9 клетками, Th17 клетками, Th22 клетками, Т-регуляторными («Treg») клетками или Т-фолликулярными вспомогательными клетками («Tfh»). Каждое подмножество CD4+ выделяет специфические цитокины, которые могут иметь либо провоспалительные, либо противовоспалительные функции, функции выживания или защитные функции. Т-клетка может быть выделена из субъекта способами селекции CD4+ или CD8+.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой Т-клетку памяти. В организме Т-клетка памяти сталкивается с антигеном. Т-клетки памяти могут располагаться во вторичных лимфоидных органах (центральные Т-клетки памяти) или в недавно инфицированной ткани (эффекторные Т-клетки памяти). Т-клеткой памяти может быть CD8+ Т-клетка. Т-клеткой памяти может быть CD4+ Т-клетка. Как используется в данном документе, «центральная Т-клетка памяти» может называться как Т-клетка, испытанная антигеном, и, например, может экспрессировать CD62L и CD45RO. Центральная Т-клетка памяти может быть обнаружена как CD62L+ и CD45RO+ с помощью центральных Т-клеток памяти, которые также экспрессируют CCR7, поэтому могут быть обнаружены как CCR7+ согласно стандартным способам проточной цитометрии.

Как используется в данном документе, «ранняя Т-клетка памяти стволовых клеток» (или «Tscm») может называться как Т-клетка, которая экспрессирует CD27 и CD45RA и, следовательно, представляет собой CD27+ и CD45RA+ согласно стандартным способам проточной цитометрии. Tscm не экспрессирует изоформу CD45 CD45RO, поэтому Tscm далее будет CD45RO- при окрашивании этой изоформы согласно стандартным способам проточной цитометрии. Следовательно, клетка CD45RO-CD27+ также представляет собой раннюю Т-клетку памяти стволовых клеток. Клетки Tscm дополнительно экспрессируют CD62L и CCR7, поэтому могут быть обнаружены как CD62L+ и CCR7+ согласно стандартным способам проточной цитометрии. Было продемонстрировано, что ранние Т-клетки памяти стволовых клеток коррелируют с повышенной стойкостью и терапевтической эффективностью продуктов клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой В-клетку. Как используется в данном документе, «В-клетка» может быть определена как клетка, которая экспрессирует CD19 и/или CD20, и/или зрелый антиген В-клетки («BCMA»), и, следовательно, В-клетка представляет собой CD19+ и/или CD20+, и/или BCMA+ согласно стандартным способам проточной цитометрии. Кроме того, В-клетка является отрицательной в отношении CD3 и CD56 согласно стандартным способам проточной цитометрии. В-клетка может быть плазматической клеткой. В-клетка может быть В-клеткой памяти. В-клетка может быть не подвергавшейся воздействию В-клеткой. В-клетка может быть IgM+ или иметь В-клеточный рецептор с переключением класса (например, IgG+ или IgA+).

К ним относятся клетки, используемые в терапии АСТ, такие как мезенхимальные стволовые клетки (*например*, выделенные из костного мозга (BM), периферической крови (PB), плаценты, пуповины (UC) или жировой ткани); гемопоэтические стволовые клетки (HSC; *например*, выделенные из BM); моноклеарные клетки (*например*, выделенные из BM или PB); эндотелиальные клетки-предшественники (EPC; выделенные из BM, PB и UC); нейральные стволовые клетки (NSC); лимбальные стволовые клетки (LSC); или тканеспецифические первичные клетки или полученные из них клетки (TSC). Клетки, используемые в АСТ-терапии, дополнительно включают плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), которые могут быть индуцированы для дифференцировки в другие типы клеток, включая, *например*, островковые клетки, нейроны и клетки крови; глазные стволовые клетки, плюрипотентные стволовые клетки (PSC); эмбриональные стволовые клетки (ESC); клетки для трансплантации органов или тканей, такие как островковые клетки, кардиомиоциты, клетки щитовидной железы, тимоциты, нейрональные клетки, клетки кожи, клетки сетчатки, хондроциты, миоциты и кератиноциты.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, такую как клетка из человека. В некоторых вариантах осуществления клетку человека выделяют из человеческого субъекта, такого как человек-донор. В некоторых вариантах осуществления клетку выделяют из PBMC или лейкопаков человека-донора. В некоторых вариантах осуществления клетка получена от субъекта с состоянием, расстройством или заболеванием. В некоторых вариантах осуществления клетка получена от донора человека с вирусом Эпштейна-Барр («EBV»).

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой моноклеарную клетку, например, из костного мозга или периферической крови. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой моноклеарную клетку периферической крови («PBMC»). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой PBMC, *например* лимфоцит или моноцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоцит периферической крови («PBL»).

В некоторых вариантах осуществления способы проводят *ex vivo*. Как используется в данном документе, «*ex vivo*» относится к способу *in vitro*, при котором клетка может быть перенесена субъекту, *например*, в качестве терапии на основе АСТ. В некоторых вариантах осуществления способ *ex vivo* представляет собой способ *in vitro*, включающий клетки или клеточную популяцию для терапии на основе АСТ.

В некоторых вариантах осуществления клетка поддерживается в культуре. В некоторых вариантах осуществления клетка трансплантируется пациенту. В некоторых вариантах осуществления клетка удаляется у субъекта, генетически модифицируется *ex vivo*, а затем вводится снова тому же пациенту. В некоторых вариантах осуществления клетка удаляется у субъекта, генетически модифицируется *ex vivo*, а затем вводится субъекту, отличного от субъекта, у которого она была удалена.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клеточную линию. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия получена от человека. В

некоторых вариантах осуществления клеточная линия представляет собой лимфобластоидную клеточную линию («LCL»). Клетка может быть криоконсервирована и разморожена. Клетка, возможно, ранее не подвергалась криоконсервации.

В некоторых вариантах осуществления клетка получена из банка клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка генетически модифицируется, а затем переносится в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка удаляется у субъекта, генетически модифицируется *ex vivo* и переносится в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированную популяцию клеток переносится в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированную популяцию иммунных клеток переносится в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления в банк клеток переносится генетически модифицированная популяция иммунных клеток, включающая первую и вторую субпопуляции, где первая и вторая субпопуляции имеют по меньшей мере одну общую генетическую модификацию и по меньшей мере одну отличающуюся генетическую модификацию.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется путем поликлональной активации (или «поликлональной стимуляции») (не антиген-специфической стимуляции). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется путем стимуляции CD3 (*например*, с помощью антитела к CD3). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется путем стимуляции CD3 и CD28 (*например*, с помощью антитела к CD3 и антитела к CD28). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется с применением готового к использованию реагента для активации Т-клетки (*например*, путем стимуляции CD3/CD28). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется путем стимуляции CD3/CD28 с обеспечением гранул. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется путем стимуляции CD3/CD28, где один или более компонентов являются растворимыми и/или один или более компонентов связаны с твердой поверхностью (*например*, пластиной или гранулой). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется антиген-независимым митогеном (*например*, лектином, включая, *например*, конканавалин А («ConA»), или РНА).

В некоторых вариантах осуществления один или больше цитокинов используются для активации Т-клеток. IL-2 необходим для активации Т-клетки и/или для содействия выживанию Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления цитокин(ы) для активации Т-клеток представляет(ют) собой цитокин, который связывается с рецептором общей гамма-цепи (γ c). В некоторых вариантах осуществления для активации Т-клетки предлагается IL-2. В некоторых вариантах осуществления для активации Т-клетки предлагается IL-7. В некоторых вариантах осуществления для активации Т-клетки предлагается IL-15. В некоторых вариантах осуществления для активации Т-клетки предлагается IL-21. В некоторых вариантах осуществления для активации Т-клетки предлагается комбинация цитокинов, включая, например, IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется путем воздействия

на клетку антигена (стимуляция антигеном). Т-клетка активируется антигеном, когда антиген представлен в виде пептида в молекуле главного комплекса гистосовместимости («МНС») (комплекс «пептид-МНС»). Когнатный антиген может быть представлен Т-клетке путем совместного культивирования Т-клетки с антигенпрезентирующей клеткой (клеткой-фидером) и антигеном. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка активируется путем совместного культивирования с антигенпрезентирующей клеткой, на которую был подан импульс антигена. В некоторых вариантах осуществления в антигенпрезентирующую клетку вводят пептид антигена.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть активирована в течение от 12 до 72 часов. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть активирована в течение от 12 до 48 часов. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть активирована в течение от 12 до 24 часов. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть активирована в течение от 24 до 48 часов. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть активирована в течение от 24 до 72 часов. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть активирована в течение 12 часов. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть активирована в течение 48 часов. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может быть активирована в течение 72 часов.

Определения

Следует отметить, что, как используется в данной заявке, формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на «композицию» включает множество композиций, а ссылка на «клетку» включает множество клеток и т. п. Использование «или» является включающим и означает «и/или», если не указано иное.

Если специально не указано в приведенном выше описании, варианты осуществления в описании, которые содержат «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие по существу из» перечисленных компонентов; варианты осуществления в описании, которые содержат «состоящий из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие по существу из» перечисленных компонентов; варианты осуществления в описании, в которых говорится «о» различных компонентах, также рассматриваются как «в» перечисленных компонентах; и варианты осуществления в описании, которые повторяют слова «состоящие по существу из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к использованию этих терминов в формуле изобретения).

Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Измеряемые и измеримые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и ошибки, связанной с измерением. Как используется в данной заявке, термины «около» и «приблизительно» имеют свои значения, понятные в данной области;

использование одного по сравнению с другим не обязательно подразумевает разную область применения. Если не указано иное, цифры, используемые в данной заявке, с модифицирующим термином или без него, например, «около» или «приблизительно», следует понимать как включающие нормальное расхождение и/или колебания, как это будет понятно специалисту в соответствующей области. В определенных вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или меньше в любом направлении (больше чем или меньше чем) от заявленного ссылочного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (кроме случаев, когда такое число превышает 100% возможного значения).

Как используется в данном описании, термин «приведение в контакт» означает установление физической связи между двумя или более объектами. Например, приведение в контакт клетки млекопитающего с композицией наночастиц означает, что клетка млекопитающего и наночастица достигают взаимодействия при физическом контакте. Способы приведения в контакт клеток с внешними объектами как *in vivo*, так и *ex vivo* хорошо известны в области биологии. Например, приведение в контакт композиции наночастиц и клетки млекопитающего, расположенной внутри млекопитающего, можно осуществлять различными путями введения (например, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным и подкожным) и может включать различные количества композиций наночастиц. Более того, композиция наночастиц может контактировать с более чем одной клеткой млекопитающего.

Как используется в данном описании, термин «доставка» означает обеспечение вещества в необходимом месте. Например, доставка терапевтического и/или профилактического средства субъекту может включать введение субъекту композиции наночастиц, включая терапевтическое и/или профилактическое средство (например, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным или подкожным путем). Введение композиции наночастиц млекопитающему или в клетку млекопитающего может включать приведение в контакт одной или более клеток с композицией наночастиц.

Как используется в данном описании, термин «эффективность инкапсуляции» относится к количеству терапевтического и/или профилактического средства, которое становится частью композиции наночастиц, по отношению к начальному общему количеству терапевтического и/или профилактического средства, используемого при получении композиции наночастиц. Например, если 97 мг терапевтического и/или профилактического средства инкапсулировано в композицию наночастиц из общих 100 мг терапевтического и/или профилактического средства, первоначально предоставленных в композицию, эффективность инкапсуляции может составлять 97%. Как используется в данном описании, термин «инкапсуляция» может относиться к полной, значительной или частичной капсуляции, ограничению, окружению или заключению в оболочку.

Как используется в данном описании, термины «эффективность редактирования»,

«процент редактирования», «эффективность удаления» и «процент удаления» относятся к общему количеству считываний последовательности со вставками или делециями относительно общего количества считываний последовательности. Например, эффективность редактирования в целевом месте генома можно измерить путем выделения и секвенирования геномной ДНК для выявления наличия вставок и делеций, внесенных при редактировании генов. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования измеряют как процент клеток, которые больше не содержат ген (например, CD3) после обработки, по отношению к числу клеток, которые первоначально содержали этот ген (например, CD3+ клеток).

Как используется в данном описании, термин «нокдаун» относится к снижению экспрессии конкретного продукта гена (например, белка, мРНК или обоих). Нокдаун белка можно измерить путем определения общего клеточного количества белка в образце, таком как ткань, жидкость или клеточная популяция. Его также можно измерить путем измерения суррогата, маркера или активности белка. Способы измерения нокдауна мРНК известны и включают анализ мРНК, выделенной из представляющего интерес образца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии конкретного продукта гена, например, к уменьшению количества транскрибируемой мРНК или уменьшению количества белка, экспрессируемого популяцией клеток (включая *in vivo* популяции, такие как те, которые обнаруживаются в тканях).

Как используется в данном описании, термин «нокаут» относится к потере экспрессии определенного гена или определенного белка в клетке. Нокаут можно измерить, например, путем определения общего клеточного количества белка в клетке, ткани или популяции клеток. Нокаут также можно обнаружить, например, на уровне генома или мРНК.

Как используется в данном описании, термин «биоразлагаемый» используется для обозначения материалов, которые при введении в клетки разрушаются клеточными механизмами (например, ферментативным разложением) или гидролизом на компоненты, которые клетки могут повторно использовать или утилизировать без значительного токсического(их) воздействия(й) на клетки. В определенных вариантах осуществления компоненты, образующиеся при разложении биоразлагаемого материала, не вызывают воспаления и/или других неблагоприятных эффектов *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемые материалы разлагаются ферментативно. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления биоразлагаемые материалы разрушаются путем гидролиза.

Как используется в данном описании, «соотношение N/P» представляет собой молярное соотношение ионизируемого атома азота, содержащегося в липиде (например, соединение формулы I), к фосфатным группам в РНК, например, в композиции наночастиц, включающей липидный компонент и РНК.

Композиции также могут включать соли одного или более соединений. Соли могут

быть фармацевтически приемлемыми солями. Как используется в данном описании, термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным описанных соединений, в которых исходное соединение изменено путем преобразования существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму (например, путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают без ограничения соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, такие как карбоновые кислоты; и т. п. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают такие соли, как ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканат, валерат и т. п. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и т. п., а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая без ограничения аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и т. п. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению включают обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли настоящего изобретения могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группу, обычными химическими способами. Как правило, такие соли можно получать путем осуществления взаимодействия форм данных соединений в виде свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси; как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются предпочтительными. Перечни подходящих солей находятся в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, and Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Как используется в данном описании, термин «индекс полидисперсности» представляет собой соотношение, которое описывает однородность распределения частиц по размеру в системе. Небольшое значение, например, менее 0,3 указывает на узкое распределение частиц по размерам. В некоторых вариантах осуществления индекс полидисперсности может быть меньше 0,1.

Как используется в данном описании, термин «трансфекция» относится к введению вида (например, РНК) в клетку. Трансфекция может происходить, например, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Термин «алкил», как используется в данном описании, представляет собой разветвленную или неразветвленную насыщенную углеводородную группу из 1-24 атомов углерода, такую как метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *втор*-бутил, *трет*-бутил, *n*-пентил, изопентил, *втор*-пентил, неопентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил, додецил, тетрадецил, гексадецил, эйкозил, тетракозил и т. п. Алкильная группа может быть циклической или ациклической. Алкильная группа может быть разветвленной или неразветвленной (т. е. линейной). Алкильная группа также может быть замещенной или незамещенной. Например, алкильная группа может быть замещена одной или более группами, включая без ограничения алкил, арил, гетероарил, циклоалкил, алкокси, amino, эфир, галогенид, гидроксид, нитро, силил, сульфоксо, сульфонат, карбоксилат или тиол, как описано в данном документе. «Низшая алкильная» группа представляет собой алкильную группу, содержащую от одного до шести (*например*, от одного до четырех) атомов углерода.

Термин «алкенил», как используется в данном описании, относится к алифатической группе, содержащей по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод, и предназначен для включения как «незамещенных алкенилов», так и «замещенных алкенилов», последние из которых относятся к алкенильным фрагментам, имеющим заместители, заменяющие водород на одном или более атомах углерода алкенильной группы. Такие заместители могут встречаться на одном или более атомах углерода, которые включены или не включены в одну или более двойных связей. Более того, такие заместители включают все заместители, которые предусмотрены для алкильных групп, как обсуждается ниже, за исключением случаев, когда этого не позволяет стабильность. Например, предполагается что алкенильная группа может быть замещена одной или более алкильными, карбоциклическими, арильными, гетероциклическими или гетероарильными группами. Иллюстративные алкенильные группы включают без ограничения винил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), аллил ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), циклопентенил ($-\text{C}_5\text{H}_7$) и 5-гексенил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

«Алкиленовая» группа относится к двухвалентному алкильному радикалу, который может быть разветвленным или неразветвленным (т. е. линейным). Любые из вышеуказанных одновалентных алкильных групп могут быть преобразованы в алкиленовые путем отщепления второго атома водорода от алкила. Репрезентативные алкилены включают C_{2-4} алкилен и C_{2-3} алкилен. Типовые алкиленовые группы включают без ограничения $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ и т. п. Алкиленовая группа также может быть замещенной или незамещенной. Например, алкиленовая группа может быть замещена одной или более группами, включая без ограничения алкил, арил, гетероарил, циклоалкил, алкокси, amino, эфир, галогенид, гидроксид, нитро, силил, сульфоксо, сульфонат, карбоксилат или тиол,

как описано в данном документе.

Термин «алкенилен» включает двухвалентные, неразветвленные или разветвленные, ненасыщенные ациклические гидрокарбильные группы, имеющие по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод и, в одном варианте осуществления, отсутствие тройных связей углерод-углерод. Любая из вышеупомянутых одновалентных алкенильных групп может быть преобразована в алкенилен путем отщепления второго атома водорода от алкенила. Репрезентативные алкенилены включают C_{2-6} алкенилены.

Подразумевается, что термин « C_{x-y} » при использовании в сочетании с химическим фрагментом, таким как алкил или алкилен, означает включение групп, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи. Например, термин « C_{x-y} алкил» относится к замещенным или незамещенным насыщенным углеводородным группам, включая алкильные и алкиленовые группы с прямой и разветвленной цепью, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи.

Термин «алкокси» относится к алкильной группе, предпочтительно к низшей алкильной группе, к которой присоединен кислород. Репрезентативные алкоксигруппы включают метокси, этокси, пропокси, трет-бутокси и т. п.

Хотя изобретения описаны в связи с проиллюстрированными вариантами осуществления, понятно, что они не предназначены для ограничения изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, настоящее изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, включая эквиваленты конкретных признаков, которые могут быть включены в изобретение, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Как вышеприведенное общее описание, так и подробное описание, а также следующие примеры являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают настоящее изобретение. Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения каким-либо образом. В случае, если любая литература, включенная посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в данном описании, термин, приведенный в данном описании, является превалирующим. Все диапазоны, указанные в заявке, охватывают конечные точки, если не указано иное.

Включение посредством ссылки

Содержание статей, патентов и патентных заявок, а также всех других документов и доступной в электронном виде информации, упомянутой или цитируемой в данном документе, настоящим включено посредством ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и индивидуально указана для включения по ссылке. Заявитель оставляет за собой право физически включать в эту заявку любые материалы и информацию из любых таких статей, патентов, патентных заявок или других физических и электронных документов.

Примеры

Пример 1 - Материалы и способы

1.1. Приготовление среды для культивирования Т-клеток.

Композиции сред для культивирования Т-клеток, используемые ниже, описаны в данном документе. «Базовая среда X-VIVO» состоит из среды X-VIVO™ 15, 1% пенстреп, 50 мкМ бета-меркаптоэтанола, 10 мМ NAC. В дополнение к вышеупомянутым компонентам, другими применяемыми изменяемыми компонентами среды были: 1. Сыворотка (фетальная бычья сыворотка (FBS)); и 2. Цитокины (IL-2, IL-7, IL-15).

1.2. Подготовка Т-клеток

Лейкаферез здорового человека-донора был получен коммерческим путем (Nemascare). Т-клетки выделяли с помощью отрицательной селекции с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stem Cell Technology, кат. номер 17951) или с помощью положительной селекции CD4/CD8 с применением StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8 MicroBeads (Milteny, кат. номер 130-122-352) на приборе MultiMACSTM Cell24 Separator Plus в соответствии с инструкцией производителя. Т-клетки криоконсервировали в среде для замораживания Cryostor CS10 (кат. №07930) для дальнейшего применения.

После оттаивания Т-клетки культивировали в полной среде для роста Т-клеток, состоящей из базовой среды CTS OpTmizer (CTS OpTmizer Media (Gibco, A3705001), дополненной 1X GlutaMAX, 10 мМ HEPES-буфером (10 мМ), и 1% пенстреп (Gibco, 15140-122), дополненного 200 МЕ/мл IL-2 (Peprotech, 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, 200-15) и 2,5% сыворотки крови человека (Gemini, 100-512). После ночи в состоянии покоя Т-клетки с плотностью 10^6 /мл активировали реагентом Т-клетки TransAct (разведение 1:100, Miltenyi) и инкубировали при 37°C в течение 24 или 48 часов. После инкубации клетки с плотностью $0,5 \times 10^6$ /мл применяли для редактирования.

Если не указано иное, тот же процесс применяли для неактивированных Т-клеток со следующими исключениями. После оттаивания неактивированные Т-клетки культивировали в полной ростовой среде CTS, состоящей из базовой среды CTS OpTmizer (Thermofisher, A10485-01), 1% пенстреп (Corning, 30-002-CI) 1X GlutaMAX (Thermofisher, 35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, 15630080), к которым добавляли 200 ед/мл IL-2 (Peprotech, 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, 200-15) с 5% сывороткой человека АВ (Gemini, 100-512), инкубировали в течение 24 ч без активации. Т-клетки высевали при плотности клеток 10^6 /мл в 100 мкл базовой среды TS OpTmizer, описанной выше, содержащей 2,5% сыворотки крови человека и цитокины для редактирования.

1.3. Получение липидных наночастиц.

Если не указано иное, липидные компоненты растворяли в 100% этаноле при различных молярных соотношениях. Грузы РНК (например, мРНК Cas9 и оgРНК) растворяли в 25 мМ цитрата, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация нагрузки РНК составляла приблизительно 0,45 мг/мл.

Если не указано иное, LNP содержали ионизируемый липид А ((9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-

(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил)октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат), холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно. Сборные композиции липид-нуклеиновая кислота были составлены с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением гРНК к мРНК 1:1 по массе, если не указано иное. В примерах 13-16 использовали соотношение гРНК к мРНК 1:2 по массе, если не отмечено иное.

Липидные наночастицы (LNP) получали с использованием метода перекрестного потока с использованием ударно-струйного смешивания липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липиды в этаноле смешивали перекрестным смешиванием с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивали с выходным потоком перекрестного смешивания через T-образное соединение (см. WO 2016010840, фиг. 2). LNP выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ) и дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.). LNP концентрировали с применением тангенциальной проточной фильтрации, *например*, на картридже с плоским листом (Sartorius, 100kD MWCO) и заменяли буфер с применением колонок для обессоливания PD-10 (GE) на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (масс./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS). В качестве альтернативы LNP необязательно концентрировали с использованием центрифужных фильтра Amicon 100 кДа, а буфер заменяли с использованием колонок для обессоливания PD-10 (GE) на TSS. Полученную смесь затем фильтровали с использованием стерильного фильтра 0,2 мкм. Конечный продукт LNP хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего применения.

1.4. Секвенирование нового поколения («NGS») и анализ эффективности целевого расщепления.

Геномную ДНК экстрагировали с применением раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen, кат. № QE09050) в соответствии с протоколом производителя.

Для количественного определения эффективности редактирования в целевом месте генома применяли секвенирование нового поколения, позволяющее выявить наличие вставок и делеций, вносимых в результате редактирования генов. ПЦР-праймеры были разработаны вокруг целевого сайта в интересующем гене (*например*, TRAC) и амплифицировали представляющую интерес геномную область. Схема последовательности праймера была выполнена в соответствии со стандартом в данной области техники.

Дополнительную ПЦР проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химических компонентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Чтения были выровнены в отношении эталонного генома человека (*например*, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Полученные файлы, содержащие считывания, сопоставляли с эталонным геномом (файлы BAM), в котором были выбраны считывания, перекрывающие

представляющую интерес целевую область, и рассчитывали число считываний дикого типа по сравнению с числом считываний, содержащих вставку или делецию («индел»).

Процент редактирования (*например*, «эффективность редактирования» или «процентное редактирование») определяли как общее количество чтений последовательности с вставками или делециями («инделы») по отношению к общему количеству чтений последовательности, включая дикий тип.

1,5. Транскрипция *in vitro* («IVT») нуклеазы мРНК

Кэпированную и полиаденилированную мРНК, содержащую N1-метилпсевдо-U, получали путем транскрипции *in vitro* с применением матрицы линейаризованной плазмидной ДНК и РНК-полимеразы T7. Плазмидную ДНК, содержащую промотор T7, последовательность для транскрипции и область полиаденилирования, линейаризовали путем инкубации при 37°C в течение 2 часов с XbaI при следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 Ед/л XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировали нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. Линейаризованную плазмиду очищали от фермента и солей буфера. Реакцию IVT для получения модифицированной мРНК проводили путем инкубации при 37°C в течение 1,5-4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линейаризованной плазмиды; 2-5 мМ каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метилпсевдо-UTP (Trilink); 10-25 мМ ARCA (Trilink); 5 Ед/мкл РНК-полимеразы T7 (NEB); 1 Ед/мкл мышинового ингибитора РНКазы (NEB); 0,004 Ед/мкл неорганической пирофосфатазы *E. coli* (NEB); и 1x реакционный буфер. TURBO ДНКазу (ThermoFisher) добавляли до конечной концентрации 0,01 Ед/мкл и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления матрицы ДНК. мРНК очищали с помощью набора для очистки транскрипции MegaClear (ThermoFisher) или набора RNeasy Maxi (Qiagen) в соответствии с протоколами производителей.

Альтернативно, мРНК очищали по протоколу преципитации, за которым в некоторых случаях следовала очистка на основе ВЭЖХ. Вкратце, после расщепления ДНКазой мРНК очищали с применением преципитации LiCl, преципитации ацетатом аммония и преципитации ацетатом натрия. В случае мРНК, очищенной ВЭЖХ, после преципитации и восстановления LiCl мРНК очищали с помощью ОФ-ИП ВЭЖХ (см., *например*, Kariko, *et al. Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 21 e142). Фракции, выбранные для объединения, объединяли и обессоливали осаждением ацетатом натрия/этанола, как описано выше. В еще одном альтернативном способе мРНК очищали методом преципитации LiCl с последующей дополнительной очисткой фильтрацией с тангенциальным потоком. Концентрации РНК определяли путем измерения поглощения света при 260 нм (Nanodrop), а транскрипты анализировали с помощью капиллярного электрофореза с помощью Bioanalyzer (Agilent).

мРНК Cas9 *Streptococcus pyogenes* («Spy») получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 9-10 (см. последовательности в таблице дополнительных последовательностей). Если последовательности, цитируемые в этом абзаце, упоминаются ниже в отношении РНК,

подразумевается, что Т следует заменить на U (которые могут быть модифицированными нуклеозидами, как описано выше). Мессенджерные РНК, применяемые в примерах, содержат 5' кэп и 3' последовательность полиаденилирования, например, до 100 нт, и представлены в таблице дополнительных последовательностей.

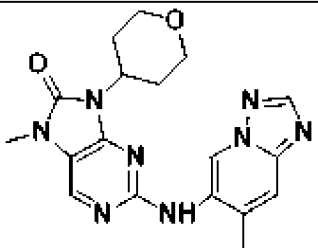
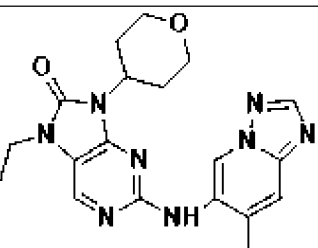
Гидовые РНК синтезировали химическим путем с помощью способов, известных в данной области техники.

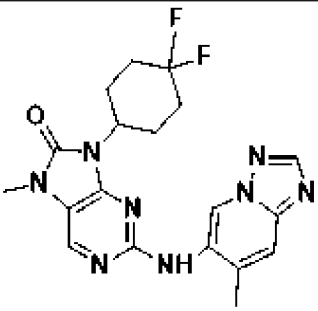
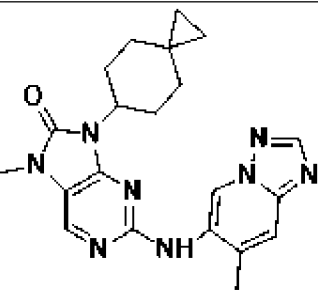
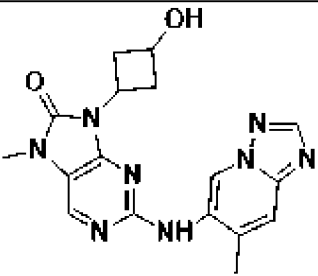
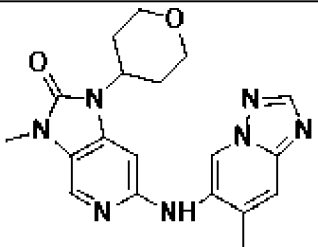
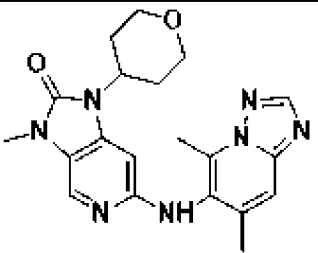
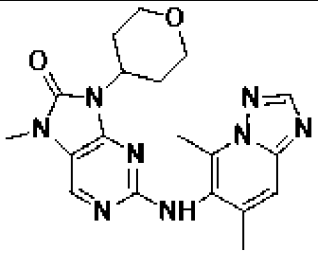
Синтез соединений

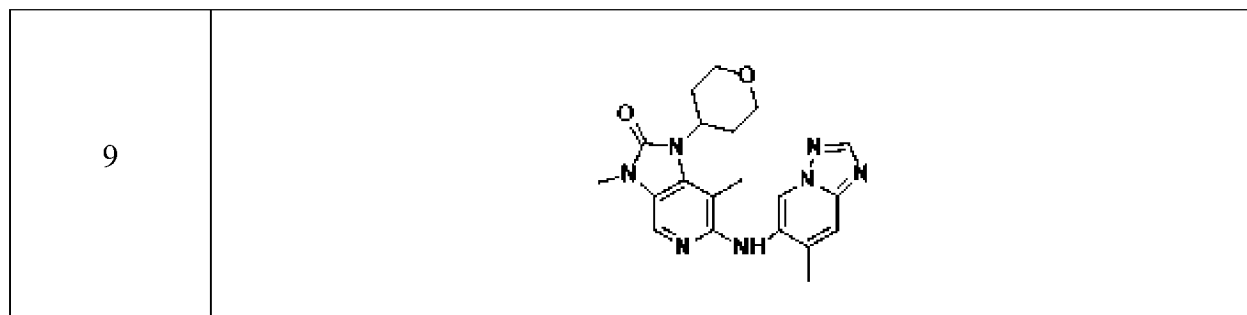
Общая информация

Все реагенты и растворители приобретали и применяли в том виде, в каком они были получены от коммерческих поставщиков, или синтезировали в соответствии с указанными процедурами. Все промежуточные соединения и конечные соединения очищали посредством колоночной флэш-хроматографии на силикагеле. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker или Varian 400 МГц, а данные ЯМР регистрировали в CDCl₃ при температуре окружающей среды. Химические сдвиги указаны в миллионных долях (м. д.) относительно CDCl₃ (7,26). Данные для ¹H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг, мультиплетность (шир.= широкий, с=синглет, д=дублет, т=триплет, к=квартет, дд=дублет дублетов, дт=дублет триплетов, м=мультиплет), константа связывания и интегрирование. Данные МС регистрировали на масс-спектрометре Waters SQD2 с источником ионизации электрораспылением (ИЭР). Чистоту конечных соединений определяли с помощью СВЭЖХ-МС-ИСП с применением прибора для жидкостной хроматографии Waters Acquity H-Class, оснащенного масс-спектрометром SQD2 с детекторами фотодиодной матрицы (PDA) и испарительного светорассеяния (ИСП).

Таблица 1. Соединения ингибитора ДНК РК

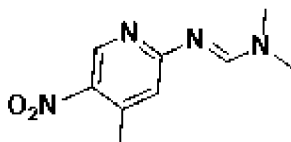
Соединение	Структура
1	
2	

3	 <chem>CN1C(=O)N2C(=N1)C=NC=C2NC3=CC=C(C=C3)C(F)(F)F</chem>
4	 <chem>CN1C(=O)N2C(=N1)C=NC=C2NC3=CC=C(C=C3)CC4CC4</chem>
5	 <chem>CN1C(=O)N2C(=N1)C=NC=C2NC3=CC=C(C=C3)CO</chem>
6	 <chem>CN1C(=O)N2C(=N1)C=NC=C2NC3=CC=C(C=C3)CC4CCNCC4</chem>
7	 <chem>CN1C(=O)N2C(=N1)C=NC=C2NC3=CC=C(C=C3)CC4CCNCC4</chem>
8	 <chem>CN1C(=O)N2C(=N1)C=NC=C2NC3=CC=C(C=C3)CC4CCNCC4</chem>



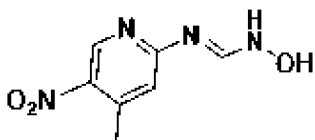
Пример 2 - соединение 1

Промежуточное соединение 1a: (E)-N, N-диметил-N'-(4-метил-5-нитропиридин-2-ил)формимидамид



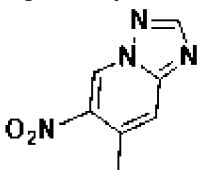
К раствору 4-метил-5-нитропиридин-2-амина (5 г, 1,0 эквив.) в толуоле (0,3 М) добавляли DMF-DMA (3,0 эквив.). Смесь перемешивали при 110°C в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали с помощью колоночной хроматографии с получением продукта в виде желтого твердого вещества (59%). ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,82 (с, 1H), 8,63 (с, 1H), 6,74 (с, 1H), 3,21 (м, 6H).

Промежуточное соединение 1b: (E)-N-гидрокси-N'-(4-метил-5-нитропиридин-2-ил)формимидамид



К раствору промежуточного соединения 1a (4 г, 1,0 эквив.) в MeOH (0,2 М) добавляли NH₂OH·HCl (2,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток распределяли между H₂O и EtOAc с последующей 2х экстракцией EtOAc. Органические фазы концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (66%). ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 10,52 (д, J=3,8 Гц, 1H), 10,08 (дд, J=9,9, 3,7 Гц, 1H), 8,84 (д, J=3,8 Гц, 1H), 7,85 (дд, J=9,7, 3,8 Гц, 1H), 7,01 (д, J=3,9 Гц, 1H), 3,36 (с, 3 H).

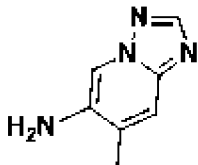
Промежуточное соединение 1c: 7-метил-6-нитро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин



К раствору промежуточного соединения 1b (2,5 г, 1,0 эквив.) в THF (0,4 М) добавляли трифторуксусный ангидрид (1,0 эквив.) при 0°C. Смесь перемешивали при

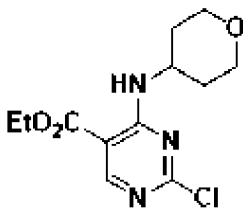
25°C в течение 18 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (44%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,53 (с, 1H), 8,49 (с, 1H), 7,69 (с, 1H), 2,78 (д, J=1,0 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 1d: 7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-амин



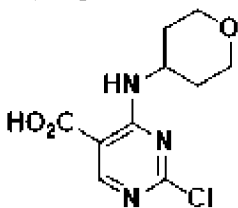
К смеси Pd/C (10% масс./масс, 0,2 эквив.) в EtOH (0,1 М) добавляли промежуточное соединение 1с (1,0 эквив.) и формиат аммония (5,0 эквив.). Смесь нагревали при 105°C в течение 2 часов. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,41 (с, 2H), 8,07 (д, J=9,0 Гц, 2H), 7,43 (с, 1H), 2,22 (с, 3H).

Промежуточное соединение 1e: этил-2-хлор-4-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)пиримидин-5-карбоксилат



К раствору тетрагидропиран-4-амина (5 г, 1,0 эквив.) и этил-2,4-дихлорпиримидин-5-карбоксилата (1,0 эквив.) в MeCN (0,25-2,0 М) добавляли K₂CO₃ (1,0 -3,0 эквив.). Смесь перемешивали при 20-25°C в течение по меньшей мере 12 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого твердого вещества (21%). ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,60 (с, 1H), 8,29 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,28 (к, J=7,1 Гц, 2H), 4,14 (дтт, J=11,3, 8,3, 4,0 Гц, 1H), 3,82 (дт, J=12,1, 3,6 Гц, 2H), 3,57 (с, 1H), 1,87-1,78 (м, 2H), 1,76-1,67 (м, 1H), 1,54 (кд, J=10,9, 4,3 Гц, 2H), 1,28 (т, J=7,1 Гц, 3H).

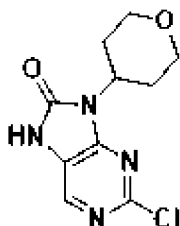
Промежуточное соединение 1f: 2-хлор-4-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)пиримидин-5-карбоновая кислота



К раствору LiOH (2,5 эквив.) в 1:1 THF/H₂O (0,25-1,0 М) добавляли промежуточное

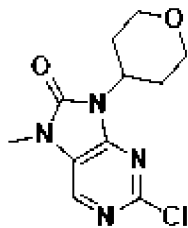
соединение 1e (3,0 г, 1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением THF. Остаток доводили до pH 2 с помощью 2 М HCl и полученный осадок собирали фильтрацией, промывали водой и сушили в вакууме с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (74%) или использовали непосредственно в виде неочищенного продукта.

Промежуточное соединение 1g: 2-хлор-9-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



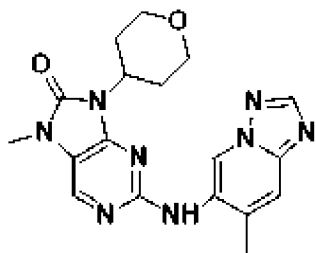
К раствору промежуточного соединения 1f (2 г, 1,0 эквив.) в MeCN (0,2-0,5 М) добавляли Et₃N (1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. Затем к смеси добавляли DPPA (1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 100°C в течение по меньшей мере 7 ч. Реакционную смесь выливали в воду и полученный осадок собирали фильтрацией, промывали водой и сушили в вакууме с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (56%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,50 (с, 1H), 8,09 (с, 1H), 4,53 (тт, J=12,4, 4,2 Гц, 1H), 4,07 (дт, J=9,5, 4,8 Гц, 2H), 3,48 (тд, J=12,1, 1,9 Гц, 2H), 2,69 (кд, J=12,5, 4,7 Гц, 2H), 1,67 (дд, J=12,1, 3,9 Гц, 2H).

Промежуточное соединение 1h: 2-хлор-7-метил-9-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



К смеси промежуточного соединения 1g (300 мг, 1,0 эквив.) и NaOH (5,0 эквив.) в 1:1 THF/H₂O (0,25-1,0 М) добавляли йодметан (2,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (47%). ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,34 (с, 1H), 4,43 (ддт, J=12,2, 8,5, 4,2 Гц, 1H), 3,95 (дд, J=11,5, 4,6 Гц, 2H), 3,43 (тд, J=12,1, 1,9 Гц, 2H), 2,45 (с, 3H), 2,40 (тд, J=12,5, 4,7 Гц, 2H), 1,66 (ддд, J=12,2, 4,4, 1,9 Гц, 2H).

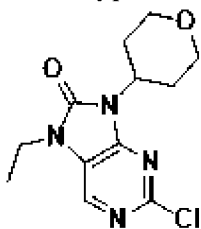
Соединение 1: 7-метил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)амино)-9-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



Смесь промежуточного соединения 1h (1,3 г, 1,0 эквив.), промежуточного соединения 1d (1,0 эквив.), Pd(dppf)Cl₂ (0,1-0,2 эквив.), XantPhos (0,1-0,2 эквив.) и Cs₂CO₃ (2,0 эквив.) в DMF (0,05-0,3 М) дегазировали и продували 3х N₂ и смесь перемешивали при 100-130°C в течение по меньшей мере 12 ч в атмосфере N₂. Затем реакционную смесь выливали в воду и экстрагировали 3х с применением DCM. Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 9,13 (с, 1H), 8,69 (с, 1H), 8,39 (с, 1H), 8,10 (с, 1H), 7,72 (с, 1H), 4,50-4,36 (м, 1H), 3,98 (дд, J=11,6, 4,4 Гц, 2H), 3,44 (д, J=11,9 Гц, 2H), 3,32 (с, 3H), 2,44-2,38 (м, 3H), 1,69 (д, J=11,6 Гц, 2H). MS: 381,3 m/z [M+H].

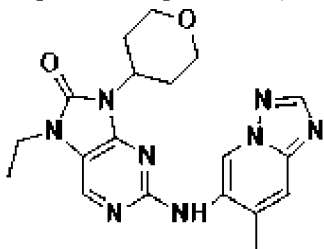
Пример 3 - соединение 2

Промежуточное соединение 2a: 2-хлор-7-этил-9-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



К смеси промежуточного соединения 1h (800 мг, 1,0 эквив.) и NaOH (5,0 эквив.) в THF (0,4 М) и H₂O (0,8 М) добавляли EtI (3,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (45%). ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,50 (с, 1H), 4,52 (тт, J=12,2, 4,2 Гц, 1H), 4,03 (дд, J=11,5, 4,6 Гц, 2H), 3,95 (к, J=7,2 Гц, 2H), 3,51 (тд, J=12,1, 1,9 Гц, 2H), 2,48 (тд, J=12,5, 4,7 Гц, 2H), 1,79-1,71 (м, 2H), 1,31 (т, J=7,2 Гц, 3H).

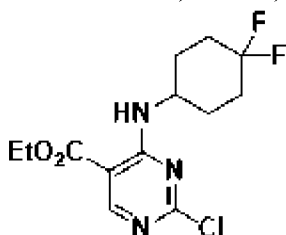
Соединение 2: 7-этил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)амино)-9-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



Соединение 2 синтезировали в виде соли TFA из промежуточного соединения 1d и промежуточного соединения 2a с применением способа, используемого для соединения 1, с последующей очисткой ВЭЖХ с обращенной фазой. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9,11 (с, 1H), 8,69 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,71 (т, $J=1,0$ Гц, 1H), 4,42 (ддд, $J=12,1, 7,9, 4,1$ Гц, 1H), 3,96 (дд, $J=11,7, 4,4$ Гц, 2H), 3,83 (к, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,41 (т, $J=11,9$ Гц, 2H), 2,40 (д, $J=1,0$ Гц, 3H), 1,68 (д, $J=11,0$ Гц, 2H), 1,23 (т, $J=7,2$ Гц, 3H). MS: 395,3 m/z [M+H].

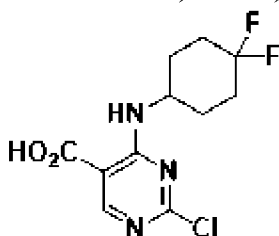
Пример 4 - соединение 3

Промежуточное соединение 3a: этил-2-хлор-4-((4,4-дифторциклогексил)амино)пиримидин-5-карбоксилат



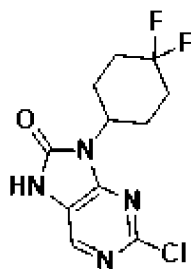
Промежуточное соединение 3a синтезировали из этил-2,4-дихлорпиримидин-5-карбоксилата и 4,4-дифторциклогексанамина гидрохлорида с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1e. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,61 (с, 1H), 8,30 (д, $J=7,7$ Гц, 1H), 4,29 (к, $J=7,1$ Гц, 2H), 4,19-4,09 (м, 1H), 2,09-1,90 (м, 6H), 1,69-1,58 (м, 2H), 1,29 (т, $J=7,1$ Гц, 3H).

Промежуточное соединение 3b: 2-хлор-4-((4,4-дифторциклогексил)амино)пиримидин-5-карбоновая кислота



Промежуточное соединение 3b синтезировали (78%) из промежуточного соединения 3a с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1f. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 13,77 (с, 1H), 8,57 (с, 1H), 8,53 (д, $J=7,8$ Гц, 1H), 4,12 (д, $J=10,2$ Гц, 1H), 2,14-1,89 (м, 6H), 1,62 (ддт, $J=17,0, 10,3, 6,0$ Гц, 2H).

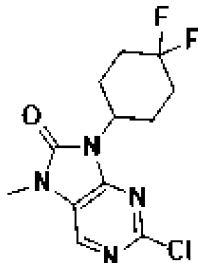
Промежуточное соединение 3c: 2-хлор-9-(4,4-дифторциклогексил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



Промежуточное соединение 3c синтезировали (56%) из промежуточного

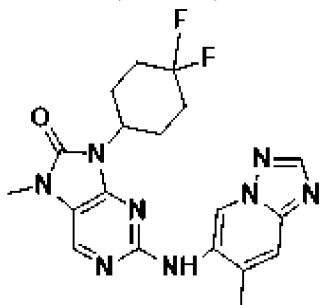
соединения 3b с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1g. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11,76-11,65 (м, 1H), 8,20 (с, 1H), 4,47 (дк, $J=12,6, 6,2, 4,3$ Гц, 1H), 2,34-1,97 (м, 6H), 1,90 (д, $J=12,9$ Гц, 2H).

Промежуточное соединение 3d: 2-хлор-9-(4,4-дифторциклогексил)-7-метил-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



К смеси промежуточного соединения 3c (1,4 г, 1,0 эквив.), NaOH (5,0 эквив.) в 5:1 THF/ H_2O (0,3 М) добавляли MeI (2,0 эквив.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого твердого вещества (47%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,01 (с, 1H), 4,53-4,39 (м, 1H), 3,43 (с, 3H), 2,73 (кд, $J=12,7, 12,1, 3,8$ Гц, 2H), 2,32-2,20 (м, 2H), 2,03-1,82 (м, 4H).

Соединение 3: 9-(4,4-дифторциклогексил)-7-метил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-6-ил)амино)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



Соединение 3 синтезировали из промежуточного соединения 1d и промежуточного соединения 3d с применением способа, используемого для соединения 1, с последующей очисткой ВЭЖХ с обращенной фазой. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9,03 (с, 1H), 8,66 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 8,10 (с, 1H), 7,71 (д, $J=1,4$ Гц, 1H), 4,36 (д, $J=12,3$ Гц, 1H), 3,31 (с, 3H), 2,38 (д, $J=1,0$ Гц, 3H), 2,11-1,96 (м, 4H), 1,81 (д, $J=12,6$ Гц, 2H). MS: 415,5 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Пример 5 - соединение 4

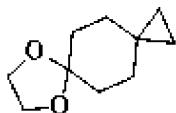
Промежуточное соединение 4a: 8-метилен-1,4-диоксапиро[4.5]декан



К раствору метил(трифенил)фосфония бромида (1,15 эквив.) в THF (0,6 М) по каплям добавляли *n*-BuLi (1,1 эквив.) при -78°C и смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 1,4-диоксапиро[4.5]декан-8-он (50 г, 1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Реакционную смесь выливали в

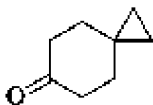
водн. NH_4Cl при 0°C , разбавляли H_2O и экстрагировали 3х с применением EtOAc . Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (51%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,67 (с, 1H), 3,96 (с, 4H), 2,82 (т, $J=6,4$ Гц, 4H), 1,70 (т, $J=6,4$ Гц, 4H).

Промежуточное соединение 4b: 7,10-диоксадиспиро[2.2.4⁶.2³]додекан



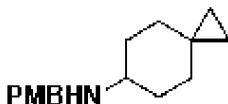
К раствору промежуточного соединения 4a (5 г, 1,0 эквив.) в толуоле (3 М) по каплям добавляли ZnEt_2 (2,57 эквив.) при -40°C и смесь перемешивали при -40°C в течение 1 часа. Затем к смеси по каплям добавляли дийодметан (6,0 эквив.) при -40°C в атмосфере N_2 . Затем смесь перемешивали при 20°C в течение 17 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь выливали в водн. NH_4Cl при 0°C и экстрагировали 2х с применением EtOAc . Объединенные органические фазы промывали солевым раствором (20 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого масла (73%).

Промежуточное соединение 4c: спиро[2.5]октан-6-он



К раствору промежуточного соединения 4b (4 г, 1,0 эквив.) в 1:1 $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (1,0 М) добавляли TFA (3,0 эквив.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением THF и pH остатка доводили до 7 с помощью 2 М NaOH (водн.). Смесь выливали в воду и 3х экстрагировали с применением EtOAc . Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого масла (68%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,35 (т, $J=6,6$ Гц, 4H), 1,62 (т, $J=6,6$ Гц, 4H), 0,42 (с, 4H).

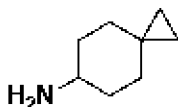
Промежуточное соединение 4d: N-(4-метоксибензил)спиро[2.5]октан-6-амин



К смеси промежуточного соединения 4c (2 г, 1,0 эквив.) и (4-метоксифенил)метанамина (1,1 эквив.) в DCM (0,3 М) добавляли AcOH (1,3 эквив.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . Затем к смеси добавляли $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (3,3 эквив.) при 0°C и смесь перемешивали при 20°C в течение 17 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением DCM , полученный остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3х EtOAc .

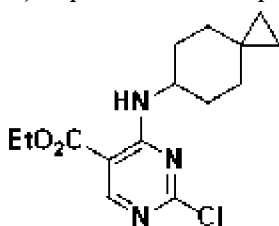
Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде серого твердого вещества (51%). ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 7,15-7,07 (м, 2H), 6,77-6,68 (м, 2H), 3,58 (с, 3H), 3,54 (с, 2H), 2,30 (ддт, $J=10,1, 7,3, 3,7$ Гц, 1H), 1,69-1,62 (м, 2H), 1,37 (тд, $J=12,6, 3,5$ Гц, 2H), 1,12-1,02 (м, 2H), 0,87-0,78 (м, 2H), 0,13-0,04 (м, 2H).

Промежуточное соединение 4e: спиро[2.5]октан-6-амин



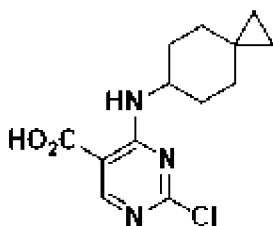
К суспензии Pd/C (10% масс./масс., 1,0 эквив.) в MeOH (0,25 M) добавляли промежуточное соединение 4d (2 г, 1,0 эквив.) и смесь перемешивали при 80°C при 50 фунт/кв. дюйм в течение 24 ч в атмосфере H_2 . Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 2,61 (тт, $J=10,8, 3,9$ Гц, 1H), 1,63 (ддд, $J=9,6, 5,1, 2,2$ Гц, 2H), 1,47 (тд, $J=12,8, 3,5$ Гц, 2H), 1,21-1,06 (м, 2H), 0,82-0,72 (м, 2H), 0,14-0,05 (м, 2H).

Промежуточное соединение 4f: этил-2-хлор-4-(спиро[2.5]октан-6-иламино)пиримидин-5-карбоксилат



Промежуточное соединение 4f синтезировали (54%) из промежуточного соединения 4e с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1e. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,64 (с, 1H), 8,41 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 4,33 (к, $J=7,1$ Гц, 2H), 4,08 (д, $J=9,8$ Гц, 1H), 1,90 (дд, $J=12,7, 4,8$ Гц, 2H), 1,64 (т, $J=12,3$ Гц, 2H), 1,52 (к, $J=10,7, 9,1$ Гц, 2H), 1,33 (т, $J=7,1$ Гц, 3H), 1,12 (д, $J=13,0$ Гц, 2H), 0,40-0,21 (м, 4H).

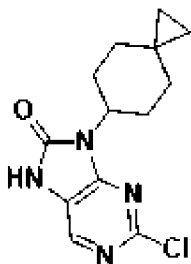
Промежуточное соединение 4g: 2-хлор-4-(спиро[2.5]октан-6-иламино)пиримидин-5-карбоновая кислота



Промежуточное соединение 4g синтезировали (82%) из промежуточного соединения 4f с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1f. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 13,54 (с, 1H), 8,38 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 8,35 (с, 1H), 3,82 (кт,

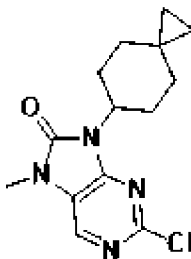
$J=8,2, 3,7$ Гц, 1H), 1,66 (дк, $J=12,8, 4,1$ Гц, 2H), 1,47-1,34 (м, 2H), 1,33-1,20 (м, 2H), 0,86 (дт, $J=13,6, 4,2$ Гц, 2H), 0,08 (дд, $J=8,3, 4,8$ Гц, 4H).

Промежуточное соединение 4h: 2-хлор-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он



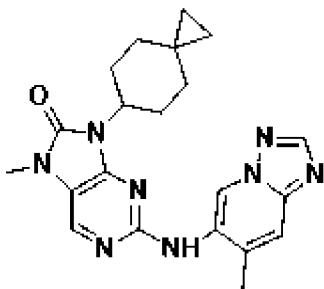
Промежуточное соединение 4h синтезировали (67%) из промежуточного соединения 4g с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1g. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11,68 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 4,26 (ддт, $J=12,3, 7,5, 3,7$ Гц, 1H), 2,42 (кд, $J=12,6, 3,7$ Гц, 2H), 1,95 (тд, $J=13,3, 3,5$ Гц, 2H), 1,82-1,69 (м, 2H), 1,08-0,95 (м, 2H), 0,39 (тдк, $J=11,6, 8,7, 4,2, 3,5$ Гц, 4H).

Промежуточное соединение 4i: 2-хлор-7-метил-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он



Промежуточное соединение 4i синтезировали (67%) из промежуточного соединения 4h с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1h. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,57 (с, 1H), 4,03 (тт, $J=12,5, 3,9$ Гц, 1H), 3,03 (с, 3H), 2,17 (кд, $J=12,6, 3,8$ Гц, 2H), 1,60 (тд, $J=13,4, 3,6$ Гц, 2H), 1,47-1,34 (м, 2H), 1,07 (с, 1H), 0,63 (дп, $J=14,0, 2,5$ Гц, 2H), -0,05 (с, 4H).

Соединение 4: 7-метил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)амино)-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он

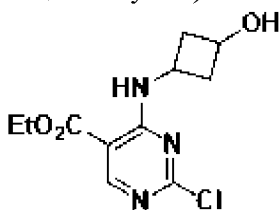


Соединение 4 синтезировали из промежуточного соединения 4i и промежуточного соединения 1d с использованием способа, примененного в соединении 1. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9,09 (с, 1H), 8,73 (с, 1H), 8,44 (с, 1H), 8,16 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 4,21 (т, $J=12,5$ Гц, 1H), 3,36 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 2,34 (дт, $J=13,0, 6,5$ Гц, 2H), 1,93-1,77 (м, 2H),

1,77-1,62 (м, 2H), 0,91 (д, J=13,2 Гц, 2H), 0,31 (т, J=7,1 Гц, 2H). МС: 405,5 m/z [M+H].

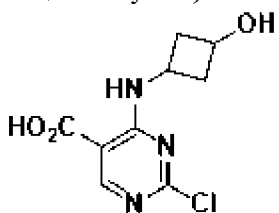
Пример 6 - соединение 5

Промежуточное соединение 5a: этил-2-хлор-4-((3-гидроксициклобутил)амино)пиримидин-5-карбоксилат



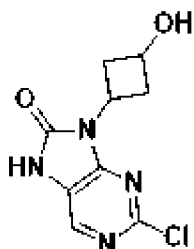
Промежуточное соединение 5a синтезировали (49%) из 3-аминоциклобутанола с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1e. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO, смесь ротамеров) δ 8,62 (с, 1H), 8,45 (дд, J=25,7, 7,1 Гц, 1H), 5,17 (дд, J=6,0, 2,7 Гц, 1H), 4,32 (к, J=7,1 Гц, 2H), 3,96 (дп, J=50,4, 7,2 Гц, 2H), 2,67 (ддд, J=11,6, 5,8, 2,8 Гц, 1H), 2,25 (тд, J=8,1, 7,0, 4,0 Гц, 1H), 1,85 (кд, J=8,7, 2,8 Гц, 1H), 1,32 (т, J=7,1 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 5b: 2-хлор-4-((3-гидроксициклобутил)амино)пиримидин-5-карбоновая кислота



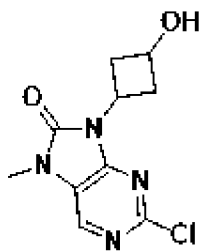
Промежуточное соединение 5b синтезировали (67%) из промежуточного соединения 5a с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1f. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO, смесь ротамеров) δ 13,82 (с, 1H), 8,70 (дд, J=25,0, 7,1 Гц, 1H), 8,63 (с, 1H), 4,65-4,29 (м, 1H), 4,17-4,02 (м, 1H), 3,95 (п, J=7,2 Гц, 1H), 2,74 (дг, J=11,8, 3,1 Гц, 2H), 2,30 (т, J=6,2 Гц, 1H), 1,88 (кд, J=8,5, 2,8 Гц, 1H).

Промежуточное соединение 5c: 2-хлор-9-(3-гидроксициклобутил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



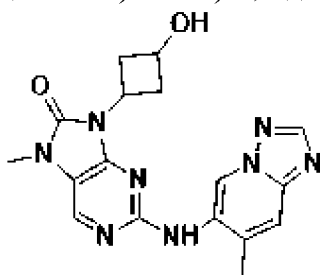
Промежуточное соединение 5c синтезировали из промежуточного соединения 5b с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1g. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO, смесь ротамеров) δ 8,12 (д, J=1,7 Гц, 1H), 7,29-7,13 (м, 1H), 4,26 (тт, J=9,8, 7,5 Гц, 1H), 4,00-3,87 (м, 1H), 2,78 (дтд, J=9,9, 8,1, 2,8 Гц, 2H), 2,59-2,52 (м, 2H).

Промежуточное соединение 5d: 2-хлор-9-(3-гидроксициклобутил)-7-метил-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



Промежуточное соединение 5d синтезировали (61%) из промежуточного соединения 5c с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1h. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,32 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 4,26 (тт, $J=9,8, 7,5$ Гц, 1H), 3,98-3,85 (м, 1H), 3,31 (д, $J=2,4$ Гц, 3H), 2,81-2,65 (м, 2H), 2,53 (ддт, $J=7,5, 4,1, 2,0$ Гц, 2H).

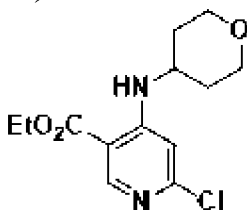
Соединение 5: 9-(3-гидроксициклобутил)-7-метил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-6-ил)амино)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



Соединение 5 синтезировали из промежуточного соединения 5d и промежуточного соединения 1d с использованием способа, примененного в соединении 1. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9,15 (с, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,38 (с, 1H), 8,10 (с, 1H), 7,72 (с, 1H), 5,15 (д, $J=6,1$ Гц, 1H), 4,26-4,17 (м, 1H), 3,94 (гепт., $J=6,8$ Гц, 1H), 3,30 (с, 3H), 2,78 (кд, $J=8,3, 2,6$ Гц, 2H), 2,61-2,54 (м, 2H), 2,41-2,39 (м, 3H). МС: 367,4 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

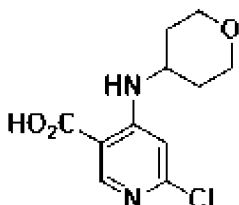
Пример 7 - соединение 6

Промежуточное соединение ба: этил-6-хлор-4-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)никотинат



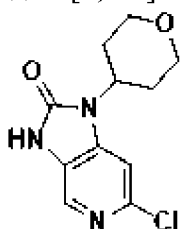
Промежуточное соединение ба синтезировали (46%) из 4,6-дихлорпиридин-3-карбоксилата и тетрагидропиран-4-амина с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1е. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,61 (с, 1H), 8,13 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 7,05 (с, 1H), 4,36 (к, $J=7,1$ Гц, 2H), 3,90 (дт, $J=11,7, 3,8$ Гц, 3H), 3,54 (тд, $J=11,4, 2,2$ Гц, 2H), 1,96 (дд, $J=12,6, 3,6$ Гц, 2H), 1,52 (дтд, $J=12,7, 10,6, 4,3$ Гц, 2H), 1,38 (т, $J=7,1$ Гц, 3H).

Промежуточное соединение бб: 6-хлор-4-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)никотиновая кислота



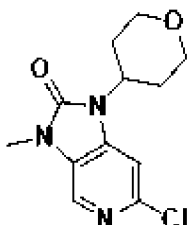
Промежуточное соединение 6b синтезировали (74%) из промежуточного соединения 6a с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1f. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,57 (с, 1H), 8,36 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,00 (с, 1H), 3,92-3,81 (м, 3H), 3,54 (тд, $J=11,4$, 2,2 Гц, 3H), 2,04-1,90 (м, 2H), 1,56-1,42 (м, 2H).

Промежуточное соединение 6c: 6-хлор-1-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он



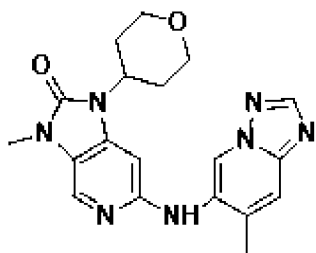
Промежуточное соединение 6c синтезировали (76%) из промежуточного соединения 6b с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1g. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11,32 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,44 (с, 1H), 4,38 (тт, $J=12,2$, 4,2 Гц, 1H), 3,94 (дд, $J=11,5$, 4,5 Гц, 2H), 3,42 (тд, $J=11,9$, 1,9 Гц, 2H), 2,31 (кд, $J=12,4$, 4,6 Гц, 2H), 1,69-1,56 (м, 2H).

Промежуточное соединение 6d: 6-хлор-3-метил-1-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он



Промежуточное соединение 6d синтезировали (63%) из промежуточного соединения 6c в 2:1 THF/ H_2O с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1h. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,15 (с, 1H), 7,50 (с, 1H), 4,43 (тт, $J=12,1$, 4,2 Гц, 1H), 3,94 (дд, $J=11,5$, 4,5 Гц, 2H), 3,43 (тд, $J=11,9$, 1,9 Гц, 2H), 3,32 (с, 3H), 2,32 (кд, $J=12,4$, 4,6 Гц, 2H), 1,63 (ддд, $J=12,2$, 4,3, 1,9 Гц, 2H).

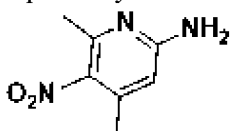
Соединение 6: 3-метил-6-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)амино)-1-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он



Соединение 6 синтезировали из промежуточного соединения 6d и промежуточного соединения 1f с использованием способа, примененного в соединении 1. ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9,78 (с, 1H), 8,31 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 8,00 (с, 1H), 7,69 (с, 1H), 7,24 (с, 1H), 4,44 (д, $J=12,5$ Гц, 1H), 4,04 (дд, $J=11,6, 4,4$ Гц, 2H), 3,52 (т, $J=11,7$ Гц, 2H), 2,50-2,46 (м, 3H), 2,32 (тт, $J=12,3, 7,0$ Гц, 2H), 1,75-1,67 (м, 2H). МС: 380,4 m/z [M+H].

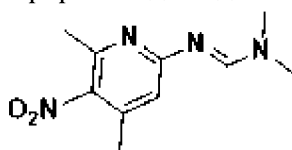
Пример 8 - соединение 7

Промежуточное соединение 7a: 4,6-диметил-5-нитропиридин-2-амин



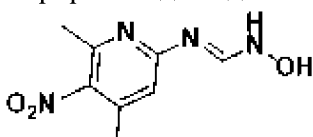
К раствору 4,6-диметилпиридин-2-амина (50 г, 1,0 эквив.) в H_2SO_4 по каплям добавляли смесь HNO_3 (3,25 эквив.) и H_2SO_4 (2,3 эквив.) при -10°C . После добавления смесь перемешивали при данной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили добавлением по каплям $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ при 0°C , разбавляли H_2O и экстрагировали 3х с использованием EtOAc . Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого твердого вещества (19%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,70 (с, 1H), 2,53 (с, 3H), 2,45 (с, 3H).

Промежуточное соединение 7b: (E)-N'-(4,6-диметил-5-нитропиридин-2-ил)-N,N-диметилформимидаид



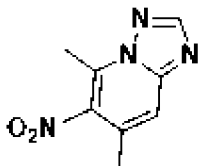
Раствор промежуточного соединения 7a (11,8 г, 1,0 эквив.) и DMF-DMA (1,1 эквив.) в толуоле (0,7 М) дегазировали и продували 3х N_2 , а смесь перемешивали при 110°C в течение 2 ч в атмосфере N. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и использовали сразу в следующей реакции без дополнительной очистки.

Промежуточное соединение 7c: (E)-N'-(4,6-диметил-5-нитропиридин-2-ил)-N-гидроксиформимидаид



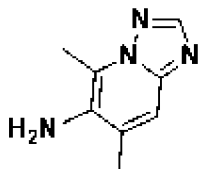
Смесь промежуточного соединения 7b (10 г, 1,0 эквив.), гидроксилamina гидрохлорида (2,0 эквив.) в MeOH (0,4-0,5 M) дегазировали и продували 3x N₂, а смесь перемешивали при 80°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток разбавляли водн. NaHCO₃ и экстрагировали 3x с помощью EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией с получением продукта (19%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,97 (д, J=9,6 Гц, 1H), 8,27 (д, J=9,5 Гц, 1H), 6,68 (с, 1H), 2,54 (с, 3H), 2,46 (с, 3H).

Промежуточное соединение 7d: 5,7-диметил-6-нитро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин



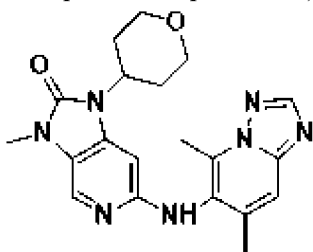
К смеси промежуточного соединения 7c (2,2 г, 1,0 эквив.) в THF (0,5 M) добавляли TFAA (1,5 эквив.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя. Остаток разбавляли водн. NaHCO₃ и экстрагировали 3x с помощью EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого твердого вещества (55%).

Промежуточное соединение 7e: 5,7-диметил-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-6-амин



К раствору промежуточного соединения 7d (1,1 г, 1,0 эквив.) в EtOH (0,5-0,6 M) добавляли NH₄CO₂H (1,0 эквив.) и Pd/C (10% масс./масс., 1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 105°C в течение 2 ч. Реакционную смесь фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (64%). ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,15 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 4,77 (с, 2H), 2,58 (с, 3H), 2,28 (с, 3H).

Соединение 7: 6-((5,7-диметил-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-6-ил)амино)-3-метил-1-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-c]пиридин-2-он

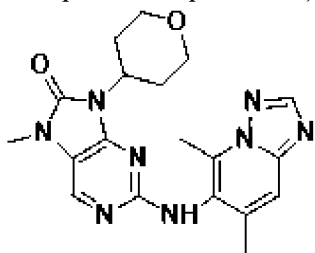


Смесь промежуточного соединения 7e (1,0 эквив.), промежуточного соединения 6d

(1,0 эквив.), BrettPhos Pd G3 (0,1 эквив.), Cs₂CO₃ (2,0 эквив.) в DMF (0,15 M) дегазировали и продували 3х N₂, а смесь перемешивали при 100°C в течение 18 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь выливали в воду и экстрагировали 3х с помощью DCM. Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,44 (с, 1H), 8,05 (с, 1H), 7,71 (с, 1H), 7,63 (с, 1H), 6,68 (с, 1H), 4,06-3,96 (м, 2H), 3,50 (д, J=11,9 Гц, 2H), 3,26 (с, 3H), 2,60 (с, 3H), 2,29 (с, 5H), 1,70 (д, J=11,5 Гц, 2H). МС: 394,4 m/z [M+H].

Пример 9 - соединение 8

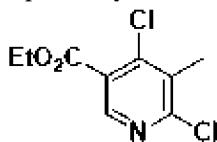
Соединение 8: 2-((5,7-диметил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)амино)-7-метил-9-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



Смесь промежуточного соединения 7e (1,0 эквив.), промежуточного соединения 1h (1,0 эквив.), Cs₂CO₃ (2,0 эквив.), Pd(dppf)Cl₂ (0,2 эквив.), XantPhos (0,4 эквив.) в DMF (0,1-0,2 M) дегазировали и продували 3х N₂, а затем смесь перемешивали при 130°C в течение 24 ч в атмосфере N₂. Смесь выливали в воду и экстрагировали 3х с помощью DCM. Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,76 (с, 1H), 8,49 (с, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,68 (с, 1H), 4,44 (с, 1H), 4,03-3,93 (м, 2H), 3,47 (д, J=12,5 Гц, 2H), 3,32 (с, 3H), 2,64 (с, 3H), 2,34 (с, 3H), 1,71 (д, J=12,3 Гц, 2H). МС: 395,4 m/z [M+H].

Пример 10 - соединение 9

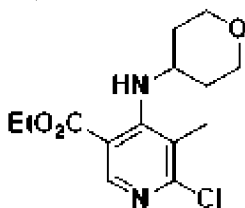
Промежуточное соединение 9a: этил-4,6-дихлор-5-метилпиридин-3-карбоксилат



К смеси 4,6-дихлор-5-метилпиридин-3-карбоновой кислоты (1,8 г, 1,0 эквив.) в EtOH (0,4-0,5 M) по каплям добавляли H₂SO₄ (1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 80°C и перемешивали в течение 12 ч. Реакционную смесь выливали в водн. NaHCO₃ и экстрагировали 2х с помощью EtOAc. Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (59%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,55 (д, J=4,2 Гц,

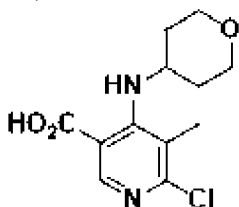
1H), 4,36 (пд, J=6,9, 3,9 Гц, 2H), 2,49 (д, J=4,3 Гц, 3H), 1,36 (тд, J=7,3, 4,0 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 9b: этил 6-хлор-5-метил-4-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)никотинат



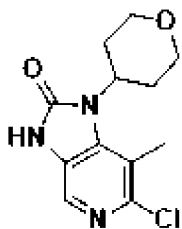
Промежуточное соединение 9b синтезировали (50%) из промежуточного соединения 9a с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1e. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8,44 (с, 1H), 7,43 (д, J=9,3 Гц, 1H), 4,31 (к, J=7,1 Гц, 2H), 3,79 (дт, J=11,7, 3,8 Гц, 2H), 3,67 (тк, J=9,7, 4,9, 4,1 Гц, 1H), 3,36 (дд, J=11,5, 2,2 Гц, 2H), 2,30 (с, 3H), 1,84-1,75 (м, 2H), 1,41 (дтд, J=17,5, 10,6, 9,6, 4,4 Гц, 2H), 1,31 (т, J=7,1 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 9c: 6-хлор-5-метил-4-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)никотиновая кислота



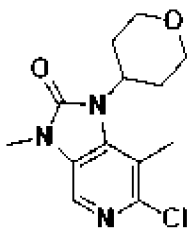
Промежуточное соединение 9c синтезировали (83%) из промежуточного соединения 9b с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1f.

Промежуточное соединение 9d: 6-хлор-7-метил-1-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он



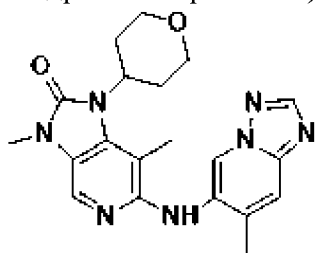
К смеси промежуточного соединения 9c (0,45 г, 1,0 эквив.), Et₃N (1,0 эквив.) в DMA (0,16 М) добавляли DPPA (1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 120°C в течение 8 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь выливали в воду, и осадок собирали фильтрацией, промывали водой и сушили в вакууме с получением остатка, который использовали непосредственно в следующей реакции без дополнительной очистки (67%).

Промежуточное соединение 9e: 6-хлор-3,7-диметил-1-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он



Промежуточное соединение 9e синтезировали (79%) из промежуточного соединения 9d с применением способа, используемого для промежуточного соединения 1h. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,79 (с, 1H), 4,55 (тт, J=12,0, 4,2 Гц, 1H), 4,08 (дд, J=11,8, 4,7 Гц, 2H), 3,40 (тд, J=12,2, 2,0 Гц, 2H), 2,81 (кд, J=12,5, 4,6 Гц, 2H), 1,66 (ддд, J=12,5, 4,2, 1,9 Гц, 2H).

Соединение 9: 3,7-диметил-6-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)амино)-1-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-он



Соединение 9 синтезировали из промежуточного соединения 1d и промежуточного соединения 9e с использованием способа, примененного в соединении. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 8,63 (с, 1H), 8,30 (с, 1H), 7,72 (с, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,54 (с, 1H), 4,65-4,56 (м, 1H), 3,95 (дд, J=11,4, 4,5 Гц, 2H), 3,43 (т, J=11,8 Гц, 2H), 3,22 (с, 3H), 2,69-2,52 (м, 2H), 2,50 (с, 3H), 2,21 (д, J=1,1 Гц, 3H), 1,71 (д, J=11,4 Гц, 2H). МС: 394,5 m/z [M+H].

Пример 11 - Обработка TRAC LNP Т-клетками с ингибиторами ДНК-ПК или без них

Т-клетки размораживали из хранилища в жидком N₂ и оставляли на ночь в среде активации роста Т-клеток с 2,5% сыворотки человека (TCGM: CTS OpTmizer (Thermofisher №A3705001) с 2,5% термоинактивированной сывороткой человека АВ (Gemini №100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher №35050061), 1% пенициллина/стрептомицина (Thermofisher №15140-122), 10 mM HEPES pH 7,4 (Thermofisher №15630080), IL-2 (200 ед/мл, Peptrotech №200-02), IL-7 (5 нг/мл, Peptrotech #200-07) и IL-15 (5 нг/мл, Peptrotech №200-15).

После ночи в состоянии покоя Т-клетки активировали TransAct (разведение 1:100, Miltenyi) в течение 48 часов перед введением. Т-клетки собирали, промывали и повторно суспендировали в TCGM без сыворотки до концентрации $1,25 \times 10^6$ клеток/мл. Раствор LNP -ApoE готовили при концентрации LNP 5 мкг/мл в 5% сыворотке человека TCGM с 1 мкг/мл ApoE3 и инкубировали при 37 градусах в течение 10 мин. Композиции LNP составляли с мРНК, кодирующей Cas9 (SEQ ID: NO 8) и оgРНК, нацеленной на TRAC человека (G013006 SEQ ID: 1), как описано в примере 1, при молярном соотношении 50/38,5/10/1,5 или 35/47,5/15/2,5 компонентных липидов липида А, холестерина, DSPC и

PEG2k-DMG, соответственно. Соотношение грузов оgPНК и мPНК Cas9 составляло 1:2 по массе. Смесь LNP-АроЕ и Т-клеток (50 000 клеток/лунка) смешивали 1:1 по объему. AAV, кодирующий матрицу направляемой гомологией репарации для вставки GFP открытой рамки считывания (OFR) в локус TRAC (SEQ ID NO: 13), добавляли при MOI 3×10^5 на вирусные геномы/клетка. Ингибиторы ДНК-ПК (соединение 1, соединение 2, соединение 3, соединение 4, соединение 5, соединение 6, соединение 7, соединение 8 или соединение 9) разводили в 2,5% сыворотке TCGM и добавляли к клеткам до достижения конечной концентрации 1, 0,25 или 0,0625 мкМ. На следующий день Т-клетки центрифугировали в 96-луночном планшете при 500 g в течение 5 мин с удалением среды, промывали один раз и повторно суспендировали в 2,5% сыворотке TCGM, и размножали в течение 5 дней. В течение 5-дневного размножения клетки разделяли один раз на 2-й день в новый 2,5% сывороточный TCGM для предотвращения избыточного роста.

11.1. Проточная цитометрия

На 5-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения эндогенного нокаута TCR и вставки GFP. Альфа-цепь Т-клеточного рецептора, кодируемая TRAC, необходима для сборки комплекса Т-клеточный рецептор/CD3 и транслокации на клеточную поверхность. Соответственно, нарушение работы гена TRAC путем редактирования генома приводит к потере белка CD3 на клеточной поверхности Т-клеток. Вкратце, отредактированные Т-клетки окрашивали буфером FACS (PBS pH 7,4, 2% FBS, 1 mM EDTA), содержащим антитело, нацеленное на CD3 (1:200), и инкубировали на льду, защищенном от света, в течение 30 минут. Клетки впоследствии промывали, повторно суспендировали в буфере FACS, содержащем DAPI (1:5000), и инкубировали на льду в защищенном от света, в течение 10 мин. После окрашивания Т-клетки промывали, повторно суспендировали в буфере FACS и анализировали на цитометре CytoFLEX LX. Т-клетки гейтировали по размеру, окрашиванию DAPI и экспрессии GFP и CD3. Результаты представлены в таблице 2 и на фиг. 1А. GFP-положительные клетки гейтировали в CD3-отрицательной популяции, как в таблице 3 и на фиг. 1В.

Таблица 2. Процент CD3-отрицательных Т-клеток после редактирования в присутствии указанных ингибиторов ДНК-ПК

Соединение	Концентрация соединения	Среднее значение % CD3 ⁻ клеток (n=3)	SD % CD3 ⁻ клеток
Соединение 1	1 мкМ	60,00	1,23
	0,25 мкМ	54,87	1,08
	0,0625 мкМ	39,43	0,25
Соединение 2	1 мкМ	57,23	0,64
	0,25 мкМ	46,30	1,21
	0,0625 мкМ	31,20	0,56

Соединение 3	1 мкМ	58,90	1,82
	0,25 мкМ	57,47	1,88
	0,0625 мкМ	50,73	0,42
Соединение 4	1 мкМ	58,93	1,94
	0,25 мкМ	53,93	1,85
	0,0625 мкМ	37,60	1,85
Соединение 5	1 мкМ	56,83	1,70
	0,25 мкМ	51,03	2,90
	0,0625 мкМ	35,40	2,75
Соединение 6	1 мкМ	58,30	1,15
	0,25 мкМ	36,20	1,22
	0,0625 мкМ	33,87	2,07
Соединение 7	1 мкМ	38,90	0,50
	0,25 мкМ	29,83	1,29
	0,0625 мкМ	30,47	1,46
Соединение 8	1 мкМ	53,87	1,36
	0,25 мкМ	33,67	0,91
	0,0625 мкМ	33,10	2,17
Соединение 9	1 мкМ	31,37	1,07
	0,25 мкМ	31,77	2,15
	0,0625 мкМ	30,20	0,79
ДМСО	1	30,37	1,01
	3	28,30	0,79
	5	28,07	1,63
Без ингибитора	LNP	33,63	1,07
Без ингибитора	LNP+AAV(1e5)	30,93	1,53
Без ингибитора	AAV(1e5)	1,09	0,25
Без ингибитора	Необработанный (UNT)	1,07	0,37

Таблица 3. Процент GFP-положительных CD3⁻отрицательных Т-клеток после редактирования в присутствии указанных ингибиторов ДНК-ПК

Соединение	Концентрация	Среднее значение %CD3 ⁻ /GFP+ клеток (n=3)	SD %CD3 ⁻ /GFP+ клеток
Соединение 1	1 мкМ	81,37	1,56

	0,25 мкМ	78,00	1,37
	0,0625 мкМ	65,63	0,83
Соединение 2	1 мкМ	79,40	0,82
	0,25 мкМ	70,07	2,31
	0,0625 мкМ	47,93	1,66
Соединение 3	1 мкМ	79,60	1,65
	0,25 мкМ	79,97	0,95
	0,0625 мкМ	75,50	0,70
Соединение 4	1 мкМ	80,07	1,72
	0,25 мкМ	78,73	0,85
	0,0625 мкМ	58,13	3,57
Соединение 5	1 мкМ	78,97	0,15
	0,25 мкМ	73,30	0,96
	0,0625 мкМ	53,00	3,64
Соединение 6	1 мкМ	74,40	1,32
	0,25 мкМ	53,50	1,61
	0,0625 мкМ	35,10	0,69
Соединение 7	1 мкМ	43,43	0,60
	0,25 мкМ	37,43	1,61
	0,0625 мкМ	29,90	1,87
Соединение 8	1 мкМ	70,07	0,85
	0,25 мкМ	44,43	2,72
	0,0625 мкМ	32,23	1,46
Соединение 9	1 мкМ	27,83	1,27
	0,25 мкМ	28,50	2,03
	0,0625 мкМ	28,27	1,90
ДМСО	1	27,10	0,85
	3	26,20	0,66
	5	25,43	1,16
Без ингибитора	LNP	0,13	0,07
Без ингибитора	LNP+AAV(1e5)	27,83	0,96
Без ингибитора	AAV(1e5)	0,81	0,72
Без ингибитора	Необработанный (UNT)	0,76	0,13

Пример 12 - Инженерия функционально активных TCR T-клеток с помощью CRISPR/Cas9 и ингибиторов ДНК-ПК

Оценивали применение ингибиторов ДНК-ПК для усиления вставки трансгенного TCR (tgTCR) в T-клетки без нарушения размножения T-клеток, цитотоксичности или высвобождения цитокинов.

12.1. Выделение T-клетки

Аферез здоровых доноров получали коммерчески (NemaCare) от трех доноров (обозначенных как 007HD, 008HD и 009HD). Клетки промывали и повторно суспендировали в буфере CliniMACS PBS/EDTA (Miltenyi кат. №130-070-525) на устройстве LOVO. T-клетки выделяли с помощью положительной селекции с использованием магнитных гранул с CD4 и CD8 (Miltenyi BioTec кат. №130-030-401/130-030-801) с использованием одноразовых наборов CliniMACS Plus и CliniMACS LS. T-клетки разделяли на аликвоты во флаконы и криоконсервировали в составе 1:1 Cryostor CS10 (StemCell Technologies кат. №07930) и Plasmalyte A (Baxter кат. №2B2522X) для будущего использования.

12.2. Среда для T-клеток и размораживание

T-клетки размораживали из хранилища в жидком N₂ и оставляли на ночь в среде активации T-клеток с 2,5% сыворотки человека (TCAM: CTS OpTmizer (Thermofisher №A3705001) с 2,5% термоинактивированной сывороткой человека AB (Gemini №100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher №35050061), 1% пенициллина/стрептомицина (Thermofisher №15140-122), 10 mM HEPES pH 7,4 (Thermofisher №15630080), IL-2 (200 ед/мл, Peptrotech №200-02), IL-7 (5 нг/мл, Peptrotech №200-07) и IL-15 (5 нг/мл, Peptrotech №200-15)).

12.3. Инженерия T-клеток

Покоящиеся T-клетки подсчитывали и повторно суспендировали в TCGM при плотности 2×10^6 клеток/мл с добавлением реагента TransAct при разведении 1:50. При этом 5 мкг/мл TRBC-LNP, составленной с мРНК, кодирующей Cas9 (SEQ ID NO: 8), и оРНК, нацеленной на TRBC (G016239) (SEQ ID NO: 2), инкубировали в TCAM с 1 мкг/мл рекомбинантным AroE3 человека перед смешиванием 1:1 по объему с T-клетками и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Через 48 ч активации T-клетки собирали, промывали и повторно суспендировали в TCAM до концентрации 1×10^6 клеток/мл. Раствор TRAC-LNP-AroE получали при 5 мкг/мл в TCAM с 5 мкг/мл AroE3. TRAC-LNP составляли с мРНК, кодирующей Cas9 (SEQ ID NO: 8), и оРНК, нацеленной на TRAC (G013006) (SEQ ID NO: 1). Смесь LNP-AroE и T-клеток смешивали 1:1 по объему. AAV, кодирующий матрицу направляемой гомологией репарации для вставки в локус TRAC HD1, WT1-специфичный ТКР, (SEQ ID NO: 13) добавляли при MOI 3×10^5 на вирусные геномы/клетка. Добавляли ингибиторы ДНК-ПК, как указано в таблице 4, при концентрации 0,25 мкМ. На следующий день T-клетки промывали, повторно суспендировали в среде для размножения T-клеток (TCEM: как описано для TCAM, за исключением 5% сыворотки человека AB вместо 2,5%), после чего переносили на

планшеты GREX (Wilson Wolf №80240M), и размножали в течение 6 дополнительных дней с пополнением цитокинов каждые 2-3 дня. Контрольные образцы обрабатывали, как описано выше, без обработки ингибитором ДНК-ПК. После размножения клетки собирали, подсчитывали с помощью счетчика клеток Vi-CELL XR и характеризовали с помощью проточной цитометрии. Кратное размножение определяли путем деления общего количества полученных клеток в конечной точке на количество клеток в каждой группе в день 0 (т. е. исходный материал). При обработке ДНК-ПК соединениями 6, 7 и 8 влияния на размножение Т-клеток не наблюдалось (таблица 4). Т-клетки криоконсервировали в среде для замораживания Cryostor CS10 для дальнейшего анализа.

Таблица 4. Кратное размножение Т-клеток после редактирования в присутствии указанных ингибиторов ДНК-ПК

Донор	Без ингибитора	Соединение 1	Соединение 3	Соединение 4
007HD	130,64	110,18	110,47	118,46
008HD	104,43	114,56	111,44	108,81
009HD	142,91	159,08	143,01	140,77
Среднее значение	125,99	127,94	121,64	122,68
SD	19,66	27,06	18,51	16,39
Р-значение по сравнению с отсутствием ингибитора		0,88	0,65	0,56

12.4. Проточная цитометрия

После инженерии и размножения Т-клетки характеризовали по эффективности редактирования и фенотипу памяти с помощью проточной цитометрии. Вкратце, Т-клетки окрашивали коктейлем антител, нацеленных на CD4, CD8, CD3ε, Vβ8, CD45RA, CD45RO, CD62L и CCR7, разведенных в буфере FACS (PBS pH 7,4, 2% FBS, 1 mM EDTA) в течение 30 минут при комнатной температуре. Антитело Vβ8 распознает специфическую Vβ-цепь, используемую WT1-TCR. После окрашивания Т-клетки промывали, повторно суспендировали в буфере FACS и анализировали с применением цитометра CytoFLEX LX. Влияние ингибитора на процентное содержание CD8+ Т-клеток в каждой группе отсутствовало (фиг. 2А). Наблюдали статистически значимое увеличение ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента) процента CD8+ клеток со вставкой WT1-TCR (CD3ε+, Vβ8+) во всех группах, обработанных ингибитором ДНК-ПК, по сравнению с группами без обработки (таблица 5, фиг. 2С), а также тенденцию к увеличению эндогенного TCR KO (фиг. 2В).

Таблица 5. Процент CD3ε+, Vβ8+ клетки среди CD8+ клеток после редактирования в присутствии указанных ингибиторов ДНК-ПК.

Донор	Без ингибитора	Соединение 1	Соединение 3	Соединение 4
007HD	59,3	87,7	88,9	87,7

008HD	59,7	85	84,6	83,6
009HD	47,2	81,3	82	80,5
Среднее значение	55,4	84,7	85,2	83,9
SD	7,1	3,2	3,5	3,6
Р-значение по сравнению с отсутствием ингибитора		0,008	0,009	0,009

12.5. Опосредованная WT1 TCR Т-клетками цитотоксичность и высвобождение цитокинов в ответ на 697 ALL и K562-HLA-A*02:01 CML линии клеток.

Оценивали способность WT1-TCR Т-клеток, созданными из доноров 007HD и 008HD, уничтожать гематологические раковые клетки, экспрессирующие естественные уровни WT1, и высвобождать цитокины. В качестве отрицательного, не уничтожающего контроля использовали клетки TCR KO, созданные, как описано выше, но без добавления TRAC/AAV. Вкратце, Т-клетки культивировали совместно с клетками 697 ALL, экспрессирующими люциферазу (697-luc2), или клетками K562-luc2, трансдуцированными для экспрессии HLA-A*02:01 (K562-HLA-A*02:01-luc2) при различных соотношениях эффекторов и мишеней (E:T) (2:1, 1:1, 0,5:1) в TCEM без добавления IL-2, IL-7 или IL-15. Примечательно, что соотношение эффекторов и мишеней было нормировано относительно вставки WT1 TCR в каждой группе, что приводило к одинаковому количеству абсолютно экспрессирующих WT1 TCR клеток в группах с ингибитором и без обработки. Через 24 ч совместного культивирования супернатанты из группы с соотношением 2:1 E:T собирали и использовали в анализе MSD U/R-PLEX для количественного определения IL-2, TNF α , IFN γ и гранзима В в соответствии с протоколом производителя (Mesoscale Discovery). Через 48 ч совместного культивирования активность люциферазы количественно определяли с помощью системы анализа люциферазы Bright-GLO (Promega) в относительных единицах люминесценции (RLU). Процент специфического лизиса определяли по формуле:

$$\% \text{ специфического лизиса} = 100 - \left(\frac{\text{RLU [Экспериментальная лунка]}}{\text{RLU [Лунка только для мишени]}} \right) * 100$$

Результаты анализа цитотоксичности представлены на фиг. 3А-3D и в таблице 6, а высвобождение цитокинов представлено в таблице 7 и на фиг. 4А-4Н. Не было отмечено заметных различий по функциональности Т-клеток в группах, обработанных ингибиторами ДНК-ПК.

Таблица 6. Процент специфического лизиса WT1-Т-клетками линий гематологического рака 697 ALL и K562-HLA-A*2:1 CML при обработке ингибитором ДНК-ПК

Е:Т	Донор	Мишен ь	Только клетки-	TCR KO	HD1	HD1+ соединение	HD1+ соединение
-----	-------	------------	-------------------	--------	-----	--------------------	--------------------

			мишени							1		3	
2	008H D	697-ALL	-1,23	0,82	-5,13	1,05	98,47	97,79	98,25	98,09	98,98	98,97	
1	008H D	697-ALL	6,36	5,22	4,69	-1,55	89,95	92,88	81,24	77,92	95,29	94,31	
0,5	008H D	697-ALL	-7,58	-3,07	-0,16	0,43	66,16	61,16	44,29	43,47	63,10	72,62	
2	007H D	697-ALL	11,92	4,41	3,20	0,99	57,73	60,09	61,43	65,54	77,64	65,49	
1	007H D	697-ALL	-0,13	1,13	1,39	-6,18	25,72	34,75	30,44	29,28	39,43	30,39	
0,5	007H D	697-ALL	-2,63	-10,18	-13,43	-23,72	6,87	6,48	5,54	12,14	4,60	2,72	
2	008H D	K562- HLA- A*02:01	-5,39	6,94	27,43	28,91	99,91	99,91	99,66	99,29	99,96	99,84	
1	008H D	K562- HLA- A*02:01	4,16	9,14	16,05	23,82	96,39	97,08	79,54	83,56	98,67	99,08	
0,5	008H D	K562- HLA- A*02:01	0,45	1,64	12,12	15,91	66,18	77,06	58,18	56,76	72,45	71,77	
2	007H D	K562- HLA- A*02:01	-3,90	7,88	11,29	12,66	81,43	83,60	92,50	95,40	98,79	96,99	
1	007H D	K562- HLA- A*02:01	-8,53	3,90	10,94	9,09	50,55	54,44	70,95	69,32	78,53	75,83	
0,5	007H D	K562- HLA- A*02:01	-8,18	1,78	2,32	5,70	31,39	29,30	36,80	37,10	47,03	41,52	

Таблица 7. Количественное определение цитокинов гранзим В, IFN γ , IL-2 и TNF- α в WT1-Т-клетках гематологических раковых линий 697 ALL и K562-HLA-A*2:1 CML

Донор	Мишень	Аналит	TCR КО	HD1	HD1+соединение 3
-------	--------	--------	--------	-----	------------------

008HD	697- ALL	Гранзим В	155	174,52	1430,80	1713,88	1277,93	1625,49	1609,68	1777,28
007HD	697- ALL	Гранзим В	621,7	514,38	1879,36	1500,30	1786,77	1972,02	1664,25	1441,06
008HD	697- ALL	IFN- гамма	69,82	77,42	5495,13	5187,14	5076,15	5420,40	6733,05	7169,43
007HD	697- ALL	IFN- гамма	254,3	173,8	905,84	586,24	1031,41	1051,85	977,71	923,97
008HD	697- ALL	IL-2	1,1	15,41	5,44	7,14	5,91	9,12	7,14	8,1
007HD	697- ALL	IL-2	2,34	1,43	1,13	1,74	2,17	2,85	4,32	2,23
008HD	697- ALL	TNF- альфа	<LLO D	1,61	11,87	17,08	13,97	15,53	16,3	18,57
007HD	697- ALL	TNF- альфа	0,47	1,37	1,49	3,06	1,76	4,16	3,46	5,29
008HD	K562- HLA- A2.1	Гранзим В	286,55	341,39	18412,6 5	17768,8 1	10683,9 6	10971,5 7	18197,0 2	17134,4 2
007HD	K562- HLA- A2.1	Гранзим В	300,93	332,79	15390,3 1	18751,7 6	20618,6 9	22750,4 4	20713,6	17178,5 4
008HD	K562- HLA- A2.1	IFN- гамма	276,26	363,41	182918, 7	187385, 1	155269, 4	141164, 2	216197, 4	200584, 6
007HD	K562- HLA- A2.1	IFN- гамма	105,58	109,31	35852,7 4	44189,5 7	55131,3 6	54976,5 2	59686,4 2	41527,0 6
008HD	K562- HLA- A2.1	IL-2	<LLO D	3,59	315,05	344,58	431,46	378,49	524,89	484,52
007HD	K562- HLA- A2.1	IL-2	1,6	1,23	128,34	301,06	295,95	308,81	415,72	176,34

008HD	K562- HLA- A2.1	TNF- альфа	<LLO D	2,64	242,11	314,86	166,01	155,87	324,18	302,06
007HD	K562- HLA- A2.1	TNF- альфа	<LLO D	0,16	28,07	46,98	51,48	60,7	73,76	66,56

Пример 13 - Редактирование в В-клетках с помощью ингибиторов протеинкиназы ДНК

Оценивали влияние ингибиторов протеинкиназы ДНК (ДНК-ПКИ) на эффективность редактирования в В-клетках.

В-клетки выделяли методом CD19-позитивной селекции из лейкопака от здорового донора человека с помощью набора StraightFrom Leukopak CD19 MicroBead (Miltenyi, 130-117-021) на приборе MultiMACS Cell24 Separator Plus. После выделения MACS CD19+ В-клетки активировали в среде IMDM или среде Stemspan и замораживали до необходимости. Базовые среды представляют собой IMDM (Corning, 10-016-CV) или StemSpan SFEM (StemCell Technologies, 9650), дополненные 1% пенициллина/стрептомицина (Corning, 30-002-CI), 50 нг/мл hIL-2 (Peprotech, 200-02), 50 нг/мл hIL-10 (Peprotech, 200-10), 10 нг/мл hIL-15 (Peprotech, 200-15), 100 нг/мл MEGACD40L, 1 мкг/мл CpG ODN 2006 (Invivogen, TLR-2006) и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). В-клетки размораживали и культивировали в среде Stemspan, дополненной 1% пенициллина/стрептомицина (Corning, 30-002-CI), 50 нг/мл hIL-2 (Peprotech, 200-02), 50 нг/мл hIL-10 (Peprotech, 200-10), 10 нг/мл hIL-15 (Peprotech, 200-15), 1 нг/мл MEGACD40L, 1 мкг/мл CpG ODN 2006 (Invivogen, TLR-2006) и 5% сыворотки человека АВ (Gemini Bio-Products, 100-512). После двух дней культивирования клетки собирали и повторно суспендировали при 100 000 клеток/100 мкл в среде Stemspan с 1% пенициллина/стрептомицина, дополненной 2х конечной концентрацией цитокина, 2 мкг/мл CpG ODN 2006 (Invivogen, TLR-2006) и 2 нг/мл MEGACD40L перед обработкой композициями LNP, доставляющими мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 8) и гРНК G000529, нацеленную на В2М.

LNP обычно получали, как описано в примере 1, с липидной композицией 50/38,5/10/1,5, выраженной в виде молярного соотношения ионизируемого липида/холестерина/DSPC/PEG, соответственно. LNP предварительно инкубировали в концентрации 5 мкг/мл общего груза РНК с 1,25 мкг/мл ApoE4 (Peprotech, 350-04) при 37°C в течение около 15 минут в среде StemSpan, дополненной 1% пенициллина/стрептомицина и 5% сыворотки человека АВ (Gemini Bio-Products, 100-512). Предварительно инкубированные LNP добавляли к В-клеткам в конечной концентрации 2,5 мкг/мл общего груза РНК с последующим добавлением 0,25 мкг/мл ингибитора ДНК-ПК соединения 1, соединения 3 или соединения 4.

В-клетки фенотипировали на наличие поверхностного белка В2М на 7-й день после

обработки композицией LNP. Для этого В-клетки инкубировали с антителами, нацеленными на CD86 (Biolegend, 374216) и В2М (Biolegend, 316312). Затем клетки окрашивали витальным красителем (Biolegend, 422801), промывали, обрабатывали на приборе Cytotflex (Beckman Coulter) и анализировали с помощью пакета программного обеспечения FlowJo. В-клетки гейтировали по размеру и статусу жизнеспособности, затем определяли экспрессию В2М в общей живой популяции. Процент В2М-негативных клеток представлен в таблице 8. В присутствии ДНК-ПКИ наблюдали повышенный процент В2М-негативных В-клеток по сравнению с отсутствием ДНК-ПКИ, что свидетельствует об усилении редактирования генов.

Таблица 8. Процент В2М-негативных клеток после редактирования с помощью ДНК-ПКИ и композиции LNP, нацеленных на В2М.

Образец	% В2М-	
	Среднее значение	SD
Без ингибитора	11,2	1,5
Соединение 1	19,2	2,3
Соединение 3	27,4	2,6
Соединение 4	24,1	1,0
Без редактирования	2,5	0,5

13.2. Редактирование В-клеток от множества доноров с помощью ингибиторов ДНК-ПК

В-клетки выделяли из PBMC, полученных от 3 доноров, как описано в примере 23.1. После выделения MACS CD19+ В-клетки активировали в среде Stemspan с 1 мкг/мл CpG ODN 2006 (Invivogen, TLR-2006), 2,5% сыворотки человека АВ (Gemini Bio-Products, 100-512), 1% пенициллина-стрептомицина (ThermoFisher, 15140122), 50 нг/мл IL-2 (Peprotech, 200-02), 50 нг/мл IL-10 (Peprotech, 200-10) и 10 нг/мл IL-15 (Peprotech, 200-15) и 1 нг/мл CD40L (Enzo Life Sciences, ALX-522-110-C010). Через два дня после активации В-клетки обрабатывали композициями LNP, доставляющими мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 8), и гРНК G000529, нацеленную на В2М. В-клетки высевали в количестве 50 000 клеток на лунку в трех экземплярах, как указано в таблице 9, в полную среду Stemspan, как описано выше.

LNP обычно получали, как в примере 1, с липидной композицией 50/38,5/10/1,5, выраженной в виде молярного соотношения ионизируемого липида/холестерина/DSPC/PEG, соответственно. LNP предварительно инкубировали при 37°C в течение 15 минут со средой Stemspan, содержащей 1 мкг/мл CpG ODN 2006, 2,5% сыворотки человека АВ, 1% пенициллина-стрептомицина, 50 нг/мл IL-2, 50 нг/мл IL-10 и 10 нг/мл IL-15, 1 нг/мл CD40L и 1,25 мкг/мл ApoE4. Предварительно инкубированные композиции LNP добавляли к В-клеткам в конечной концентрации 2,5 мкг/мл общего груза РНК с последующим добавлением 0,25 мкг/мл ингибитора ДНК-ПК соединения 1 или соединения 4. Через семьдесят два часа после добавления композиции LNP клетки

промывали, повторно суспендировали в среде Stemspan, содержащей 1 мкг/мл CpG ODN 2006, 2,5% сыворотки человека АВ, 1% пенициллина-стрептомицина, 50 нг/мл IL-2, 50 нг/мл IL-10 и 10 нг/мл IL-15 и 100 нг/мл CD40L и переносили в 48-луночный планшет.

Через семь дней после обработки композицией LNP клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии. Вкратце, В-клетки инкубировали с антителами, нацеленными на CD19 (Biolegend, 363010A), CD20 (Biolegend, 302322), CD86 (Biolegend, 374216) и B2M (Biolegend, 395806), после чего добавляли витальный краситель DAPI (Biolegend, 422801). Клетки затем промывали, обрабатывали с помощью прибора Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. В-клетки гейтировали по размеру и статусу жизнеспособности, затем определяли экспрессию B2M в общей живой популяции. В таблице 9 и на фиг. 5 показан средний процент B2M-негативных клеток после редактирования ингибиторами ДНК-ПК. Добавление ингибиторов ДНК-ПК умеренно повышало эффективность редактирования.

Таблица 9. Средний процент B2M-негативных клеток после редактирования ингибиторами ДНК-ПК

Донор	Неотредактированные Без ингибитора			Без ингибитора			Соединение 1			Соединение 4		
	Среднее значение	SD	N	Среднее значение	SD	N	Среднее значение	SD	N	Среднее значение	SD	N
Донор 150	3,74	1,62	3	50,57	1,54	3	56,41	4,39	3	59,42	4,16	3
Донор 200	5,11	0,06	2	27,60	4,16	3	36,77	1,79	3	34,88	8,44	3
Донор 340	0,70	0,43	3	45,61	3,23	3	56,28	3,01	3	57,59	3,52	3

Пример 14 - Вставка в НК-клетки с использованием ингибиторов ДНК-ПК

НК-клетки оценивали на предмет влияния ингибиторов протеинкиназы ДНК (ДНК-ПКИ) на инделы и скорости вставок. НК-клетки обрабатывали композициями LNP, доставляющими мРНК, кодирующие Cas9 (SEQ ID NO: 8), и гРНК G000562, нацеленные на AAVS1, в присутствии ингибиторов протеинкиназы ДНК. Подмножество образцов также обрабатывали AAV, кодирующим кодирующую последовательность GFP, фланкированную участками, гомологичными сайту редактирования AAVS1 (SEQ ID NO: 16).

НК-клетки выделяли из коммерчески полученного лейкопака с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL, кат. № 17955) согласно протоколу производителя. Первичные НК-клетки человека активировали и размножали с использованием клеток K562-41BBL в качестве питающих клеток в среде OpTmizer с 5%

	значение		значение		значение		значение	
Только AAV	2,68	0,37						
Отсутствие ДНК-ПКИ	74,93	4,09						
Соединение 1			85,47	2,48	90,23	1,66	92,30	1,66
Соединение 4			88,10	1,00	90,63	1,01	90,27	3,09

Пример 15 - Мультиредактирование с двумя вставками в Т-клетках

Для демонстрации инженерии Т-клеток с пятью различными редактированиями Cas9 здоровые клетки донора последовательно обрабатывали пятью композициями LNP, совместно составленными с мРНК, кодирующей Cas9 (SEQ ID NO: 8), и оРНК, нацеленной либо на TRAC (G013006), TRBC (G016239), СИТА (G013676), HLA-A (G018995), либо на AAVS1 (G000562). Трансгенный WT1, нацеленный на TCR, был сайт-специфически интегрирован в сайт разреза TRAC путем доставки матрицы гомологичной направленной репарации (SEQ ID NO: 14) с использованием AAV. В качестве эксперимента также проводили сайт-специфическую интеграцию GFP в целевой сайт AAVS1 с использованием второй матрицы гомологичной репарации (SEQ ID NO: 15).

Т-клетки выделяли из продуктов лейкофереза двух здоровых доноров HLA-A*02:01+ (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies, 17951) в соответствии с протоколом производителя и криоконсервировали с помощью Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies, 07930). За день до начала редактирования Т-клеток клетки размораживали и оставляли на ночь в среде для активации Т-клеток (TCAM: CTS OpTmizer (Thermofisher, A3705001) с добавлением 2,5% сыворотки человека AB (Gemini, 100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher, 35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, 15630080), 200 ед/мл IL-2 (Peprotech, 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, 200-07) и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, 200-15).

Обработка и размножение Т-клеток с помощью композиции LNP

LNP обычно получали, как описано в примере 1, с липидной композицией 50/38,5/10/1,5, выраженной в виде молярного соотношения ионизируемого липида/холестерина/DSPC/PEG, соответственно. Непосредственно перед воздействием Т-клетками композиции LNP предварительно инкубировали в среде, содержащей AroE. Экспериментальный дизайн последовательных стадий редактирования и контрольных групп приведен в таблице 12.

Таблица 12. План исследования

Группа	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	Цель
Неотредактированные	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отрицательный контроль
Только GFP-AAV	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	AAV-GFP	Отсутствует	Контроль эписомальной

						экспрессии GFP
Только редактирован ие TCP	Отсутств ует	Отсутств ует	TRAC LNP+WT1 AAV	Отсутств ует	TRBC	Контроль замены TCP
Пятикратное редактирован ие	СИТА	HLA-A	TRAC LNP+WT1 AAV	AAVS1+ AAV- GFP	TRBC	Эксперимента льная часть

День 1: композиции LNP, нацеленные на СИТА, как указано в таблице 12, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, что содержит 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Т-клетки собирали, промывали и повторно суспендировали при плотности 2×10^6 клеток/мл в TCAM с разбавлением 1:50 реагента Т-клетки TransAct человека (MilteNY, 130-111-160). Т-клетки и растворы LNP-ApoE затем смешивали в соотношении 1:1 по объему и Т-клетки высевали в культуральные флаконы на ночь.

День 2: композиции LNP, нацеленные на HLA-A, как указано в таблице 12, инкубировали в концентрации 25 мкг/мл в TCAM, что содержит 20 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:10 по объему.

День 3: композиции LNP, нацеленные на TRAC, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, что содержит 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Т-клетки собирали, промывали и повторно суспендировали при плотности 1×10^6 клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 по объему и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. Затем к каждой группе добавляли WT1 AAV при MOI 3×10^5 копий генома на клетку. В каждую группу добавляли ингибитор ДНК-ПК соединение 4 в концентрации 0,25 мкМ.

День 4: композиции LNP, нацеленные на AAVS1, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, что содержит 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и повторно суспендировали при плотности 1×10^6 клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 по объему и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. Затем к каждой группе добавляли GFP-AAV при MOI 3×10^5 копий генома на клетку. В каждую группу добавляли ингибитор ДНК-ПК соединение 4 в концентрации 0,25 мкМ.

День 5: композиции LNP, нацеленные на TRBC, как указано в таблице 12, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, что содержит 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Т-клетки собирали, промывали и повторно суспендировали при плотности 1×10^6 клеток/мл в TCAM. Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:1 по объему.

День 6-11: Т-клетки переносили на 24-луночный планшет GREX (Wilson Wolf, 80192) в среду для размножения Т-клеток (TCEM: CTS OpTmizer (Thermofisher,

A3705001), дополненную 5% заменителем сыворотки иммунных клеток CTS (Thermofisher, A2596101), 1X GlutaMAX (Thermofisher, 35050061), 10 mM HEPES (Thermofisher, 15630080), 200 ед/мл IL-2 (Peprotech, 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, 200-15)) и размножали в соответствии с протоколами производителей. Вкратце, Т-клетки размножали в течение 6 дней с заменой среды каждые два дня.

Количественная оценка редактирования Т-клеток с помощью проточной цитометрии и NGS

После размножения отредактированные Т-клетки окрашивали антителами, нацеленными на HLA-A*02:01 (Biolegend 343307), HLA-DR-DP-DQ (Biolegend 361712), WT1-TCR (Vb8⁺, Biolegend 348104), CD3e (Biolegend 300328), CD4 (Biolegend 317434), CD8 (Biolegend 301046) и Viakrome 808 Live/Dead (кат. C36628). Этот коктейль использовали для определения нокаута HLA-A*02:01 (HLA-A2⁻), нокаута HLA-DR-DP-DQ посредством нокаута СПТА (HLA-DRDPDQ⁻), вставки WT1-TCR (CD3⁺Vb8⁺) и процента клеток, экспрессирующих остаточный эндогенный TCR (CD3⁺Vb8⁻). Вставку в сайт AAVS1 отслеживали по экспрессии GFP. После инкубации антителами клетки промывали, обрабатывали на приборе Cytoflex LX (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки гейтировали по размеру и статусу CD4/CD8 перед исследованием маркеров редактирования и вставки. Скорости редактирования и вставки приведены в таблице 13 и таблице 14 для CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, соответственно. На фиг. 7A-7F представлены графики скорости редактирования всех мишеней в CD8⁺ Т-клетках. Процент Т-клеток со всеми предполагаемыми редактированиями (т. е. вставкой WT1-TCR и GFP в сочетании с нокаутом HLA-A и СПТА) гейтировали как % CD3⁺ Vb8⁺ GFP⁺ HLA-A⁻ HLA-DRDPDQ⁻. Высокие уровни нокаута HLA-A и СПТА, а также вставки GFP и WT1-TCR, наблюдали в пятикратно отредактированных образцах от обоих доноров с получением >75% полностью отредактированных CD8⁺ Т-клеток и >85% полностью отредактированных CD4⁺ Т-клеток.

Таблица 13. Показатели редактирования в CD8⁺ Т-клетках в донорах А и В

Маркер	Неотредактированные		Только GFP-AAV		Только отредактированное TCR		Пятикратное редактирование	
	А	В	А	В	А	В	А	В
GFP+	0,0	0,0	0,3	0,7	0,0	0,0	88,4	93,1
HLA-A2-	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	99,7	99,4
HLA-DRDPDQ-	31,9	29,6	30,0	32,0	40,5	56,7	99,0	98,7
CD3+Vb8-	93,3	96,4	94,1	95,8	0,2	0,3	1,0	0,8
CD3+Vb8+	6,0	3,5	5,5	4,0	92,3	94,3	86,7	92,1

Маркер	Неотредактированные		Только GFP-AAV		Только редактирование TCP		Пятикратное редактирование	
	A	B	A	B	A	B	A	B
CD3+Vb8+ GFP+ HLA-A-, HLA- DRDPDQ-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	76,7	84,8

Таблица 14. Показатели редактирования в CD4+ Т-клетках в донорах А и В

Маркер	Неотредактированные		Только GFP-AAV		Только редактирование TCP		Пятикратное редактирование	
	A	B	A	B	A	B	A	B
GFP+	0,0	0,0	0,9	1,3	0,0	0,0	86,4	91,3
HLA-A2-	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	99,5	99,2
HLA-DRDPDQ-	77,0	73,6	71,3	75,0	93,1	96,1	99,2	99,1
CD3+Vb8-	94,6	94,6	94,8	94,2	0,3	0,4	1,3	1,3
CD3+Vb8+	5,1	5,1	4,9	5,4	86,3	90,9	80,7	91,0
Vb8+ GFP+ HLA-A- HLA-DRDPDQ-	0,6	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	86,1	90,6

Пример 16 - Оценка активности композиции LNP в условиях сыывороточной среды

Для оценки эффективности редактирования композиции LNP композиции LNP тестировали *in vitro*, чтобы оценить влияние альтернативных условий среды на эффективность вставки в CD3-позитивных Т-клетках. Т-клетки обрабатывали композициями LNP с различным молярным соотношением липидных компонентов, инкапсулирующих мРНК Cas9 и гРНК, нацеленную на ген TRAC. Вирусная конструкция AAV6 доставляла матрицу гомологически направленной репарации (HDR), кодирующую репортер GFP, фланкированный гомологическими плечами для сайт-специфической интеграции в локус TRAC (Vigene; SEQ ID NO: 17). Нарушение работы гена TRAC оценивали с помощью проточной цитометрии на предмет потери поверхностных белков Т-клеточных рецепторов. Вставку оценивали с помощью проточной цитометрии по свечению GFP.

Композиции LNP предварительно инкубировали с АроЕ3. В каждую лунку добавляли равный объем среды АроЕ3. Впоследствии в каждый планшет с Т-клетками добавляли 100 мкл смеси LNP-АроЕ. Конечная концентрация LNP при максимальной дозе была установлена на уровне 5 мкг/мл. Конечные концентрации АроЕ3 составляли 5 мкг/мл, а конечная плотность Т-клеток составляла 0,5e6 клеток/мл. Планшеты

инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 7 дней, а затем собирали для анализа с помощью проточной цитометрии.

LNP обычно получали, как описано в примере 1, с липидной композицией, как отмечено в таблице 15, выраженных в виде молярного соотношения ионизируемого липида A/холестерина /DSPC/PEG, соответственно. Композиции LNP, доставляли мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 8), и огРНК, нацеленную на, и огРНК (SEQ ID NO. 1), нацеленную на TRAC человека. Соотношение грузов огРНК и мРНК Cas9 составляло 1:2 по массе.

Таблица 15. Результаты анализа состава LNP

НОМЕР LNP	Молярное соотношение композиции	Инкапсуляция (%)	Z-Средн. размер (нм)	PDI	Среднечисл. размер (нм)	Соотношение N/P
КОМПОЗИЦИЯ 1 (Сравнение)	50/38,5/10/1,5	98%	113	0,03	102	6
КОМПОЗИЦИЯ 16	35/47,5/15/2,5	98%	78	0,03	72	6

T-клетки от одного донора (партия №W0106) готовили, как описано в примере 1, со следующими модификациями среды. T-клетки помещали в среду, дополненную или 2,5% сывороткой человека АВ (HABS), 2,5% заменителем сыворотки (SR) CTS Immune Cell (Gibco, кат № A25961-01), 5% заменителем сыворотки (SR), или комбинацией 2,5% сыворотки человека АВ и 2,5% заменителя сыворотки. T-клетки активировали через 24 часа после размораживания, как описано в примере 1.2. Через два дня после активации T-клетки трансфицировали композициями LNP, как описано в примере 16.1, при концентрациях LNP 0,31 мкг/мл, 0,63 мкг/мл, 1,25 мкг/мл и 2,5 мкг/мл. В каждую лунку добавляли AAV6, кодирующий матрицу гомологически направленной репарации (HDR), которая кодирует GFP-репортер (Vigene; SEQ ID NO: 13), фланкированный гомологическими плечами для сайт-специфической интеграции в локус TRAC, при кратности заражения (MOI) 3×10^5 вирусных частиц/клетку. Низкомолекулярный ингибитор ДНК-зависимой протеинкиназы, соединение 4, добавляли при 0,25 мкМ.

Через пять дней после трансфекции T-клетки фенотипировали методом проточной цитометрии, как описано в примере 14, для оценки эффективности введения композиций LNP. В таблице 16 приведен процент CD3-отрицательных клеток. Альфа-цепь T-клеточного рецептора, кодируемая TRAC, необходима для сборки комплекса T-клеточный рецептор/CD3 и транслокации на клеточную поверхность. Соответственно, нарушение работы гена TRAC путем редактирования генома приводит к потере белка CD3 на клеточной поверхности T-клеток. Средний процент GFP-позитивных T-клеток для каждого состояния среды представлен в таблице 17 и на фиг. 8A-8B. Клетки, экспрессирующие белок GFP, указывают на успешную вставку в геном.

Таблица 16 - Процент CD3-отрицательных Т-клеток после обработки активированных Т-клеток AAV и указанным составом LNP.

Композиция	LNP (мкг/мл)	2,5% HABS		2,5% SR		5% SR		2,5% HABS и 2,5% SR	
		Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
50/38,5/10/1,5	2,5	94,55	0,07	99,00	0,14	97,95	0,07	99,25	0,07
	1,25	92,25	0,35	96,05	1,20	92,10	2,55	95,95	0,21
	0,63	76,55	0,21	76,60	3,11	63,55	2,47	74,70	1,27
	0,31	48,35	1,34	25,95	1,20	16,55	2,47	41,55	1,20
35/47,5/15/2,5	2,5	99,40	0,00	98,80	0,42	98,65	0,07	98,70	0,14
	1,25	98,85	0,07	98,95	0,64	98,50	0,14	97,25	0,35
	0,63	94,10	0,28	96,80	0,42	95,25	0,35	84,60	1,41
	0,31	75,20	0,14	68,75	9,97	64,20	0,57	50,30	1,56

Таблица 17. Процент GFP+ клеток после обработки активированных Т-клеток AAV и указанными составами LNP.

LNP	Доза (мкг/мл)	2,5% HABS		2,5% SR		5% SR		2,5% HABS и 2,5% SR	
		% вставки (среднее значение)	SD	% вставки (среднее значение)	SD	% вставки (среднее значение)	SD	% вставки (среднее значение)	SD
50/38,5/10/1,5	2,5	94,6	0,0	95,4	0,4	93,7	0,6	90,0	0,1
	1,25	92,3	0,3	92,3	0,5	87,7	1,8	75,1	1,1
	0,63	76,6	0,1	76,3	1,3	63,1	1,8	31,2	2,6
	0,31	48,4	0,9	30,5	1,0	19,5	2,5	5,0	0,7
35/47,5/15/2,5	2,5	95,6	0,0	96,3	0,5	95,6	0,1	94,7	0,4
	1,25	94,8	0,5	96,0	1,4	95,6	0,0	91,1	0,2
	0,63	89,6	0,6	93,3	0,5	91,1	0,2	78,8	1,0
	0,31	74,7	0,1	75,0	0,0	64,4	0,4	48,8	1,2

16.1. Трансфекция Т-клеток с помощью LNP

Трансфекцию с помощью кривых «доза-эффект» LNP (DRC) проводили на системе обработки жидкостей Hamilton Microlab STAR. Для работы с жидкостью обеспечивали следующее: (а) 4X желаемая максимальная доза LNP в верхнем ряду 96-луночного планшета с глубокими лунками, (б) AroE3, разведенный в среде в концентрации 20 мкг/мл, (с) полная среда для выращивания Т-клеток, состоящая из базовой среды CTS OrTmizer, как описано ранее в примере 1, и (д) Т-клетки, высеянные с плотностью 10^6 /мл

в 100 мкл в 96-луночные планшеты с плоским дном для тканевых культур. При работе с жидкостью сначала выполняли 8-точечное двукратное серийное разведение LNP, начиная с 4X дозы LNP на планшете с глубокими лунками. Затем в каждую лунку добавляли равный объем среды с AroE3, получая разведение 1:1 как LNP, так и AroE3. Впоследствии в каждый планшет с Т-клетками добавляли 100 мкл смеси LNP-AroE. Конечная концентрация LNP при максимальной дозе была установлена на уровне 5 мкг/мл. Конечные концентрации AroE3 составляли 5 мкг/мл, а конечная плотность Т-клеток составляла $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 24 или 48 часов для активированных или активированных Т-клеток, соответственно. После инкубации Т-клетки, обработанные LNP, собирали и анализировали на предмет целевого редактирования или обнаружения экспрессии белка Cas9. Оставшиеся клетки культивировали в течение 7-10 дней после обработки композиции LNP и экспрессию белка на поверхности оценивали с помощью проточной цитометрии.

Пример 17 - Сравнение нецелевых структурных изменений ДНК-ПКИ с помощью UnIT

В этом эксперименте оgPHK, нацеленную на TRAC (G013006), обработанная соединением 3 или соединением 4, анализировали на наличие нецелевых транслокаций структурных изменений по сравнению с неотредактированной или необработанной оgPHK TRAC.

На 8-й день после редактирования Т-клетки примера 12 из необработанных, неототредактированных, содержащих соединения 3 и 4 направляющих образцов собрали, центрифугировали, а гранулы непосредственно использовали в качестве исходного материала для выделения гДНК с использованием «Zymo Quick DNA/RNA Mag Beads Kit» (Zymo Cat. R2131). К этим образцам гДНК применяли анализ структурных вариантов UnIT. Высокомолекулярную геномную ДНК одновременно фрагментировали и маркировали последовательностью («тагментация») с помощью транспозазы Tn5 и адаптера с частичной последовательностью Illumina P5 и уникальным молекулярным идентификатором (UMI) длиной 12 п.н. Две последовательные ПЦР с использованием праймера для P5 и праймеров, специфичных для генов (GSP), вложенных пополам, сообщающих Illumina последовательность P7 для создания двух совместимых с Illumina библиотек NGS на образец (Illumina, Ref. 15033624). Секвенирование в обоих направлениях целевого участка разреза CRISPR/Cas9 с помощью двух библиотек позволяет сделать вывод и количественно оценить структурные варианты результатов репарации ДНК после редактирования генома. Если два фрагмента были выровнены по разным хромосомам, SV классифицировали как «межхромосомную транслокацию». Величина структурного изменения представлена на фиг. 9А и в таблице 18. Процент вставки представлен на фиг. 9В и в таблице 19.

Таблица 18. Непредусмотренное структурное изменение

Образец	Среднее значение	SD
Неотредактированные	0,28	0,08
Обработка без ПКИ	1,89	0,09
Обработанное соединение 3	1,30	0,24
Обработанное соединение 4	1,46	0,28

Таблица 19. Процент вставки

Образец	Среднее значение	SD
Неотредактированные	0,11	0,19
Обработка без ПКИ	32,02	4,41
Обработанное соединение 3	68,35	3,99
Обработанное соединение 4	67,82	2,98

Пример 18 - Нецелевой анализ направляющих TRAC и TRBC с помощью ДНК-ПКИ

T-клетки из примера 12 подвергали скринингу для валидации нецелевых геномных сайтов, нацеленных на TRAC и TRBC, и проводили его в соответствии с Integrated DNA Technologies, протокол IDT rhAmpSeq rhPCR. В этом эксперименте 2 огРНК, нацеленные на TRAC и TRBC, в сочетании с ДНК-ПКИ соединением 3 и соединением 4 подвергали скринингу для валидации нецелевых профилей. Количество валидированных нецелевых сайтов для огРНК, нацеленных на TRAC (G013006) и TRBC (G016239), представлены в **таблице 20**. Нецелевые сайты валидировали, если значение p было менее 0,05 процента индела. Из 173 нецелевых сайтов, выявленных для огРНК, нацеленных на TRAC, 0 сайтов были валидированы. Из 92 нецелевых сайтов, выявленных для огРНК, нацеленных на TRBC, 0 сайтов были валидированы.

Таблица 20. Валидация нецелевого сайта направляющих TRAC и TRBC с помощью ДНК-ПКИ

Идентификатор гРНК	ДНК-ПКИ	Мишень	Направляющая последовательность (SEQ ID NO:)	Нецелевые сайты	Валидированные сайты
G013006	Н/Д	TRAC	CUCUCAGCUGGUAC ACGGCA	173	0
G013006	Соединение 3	TRAC	CUCUCAGCUGGUAC ACGGCA	173	0
G013006	Соединение 4	TRAC	CUCUCAGCUGGUAC ACGGCA	173	0
G016239	Н/Д	TRBC	GGCCUCGGCGCUGA	92	0

			CGAUCU		
G016239	Соединение 3	TRBC	GGCCUCGGCGCUGA CGAUCU	92	0
G016239	Соединение 4	TRBC	GGCCUCGGCGCUGA CGAUCU	92	0

Пример 19- опосредованная SpyCas9 вставка иммунологического рецептора в TRAC с или без ингибиторов ДНК-ПК

19.1. Получение Т-клеток

Компоненты афереза от здоровых доноров получали коммерческим путем (Nemascare, кат. №PB001F-2), клетки промывали, повторно суспендировали в буфере CliniMACS® PBS/EDTA (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) и обрабатывали в устройстве MultiMACS™ Cell 24 Separator Plus (Miltenyi Biotec). Т-клетки выделяли посредством положительной селекции с помощью набора Straight от Leukopak® CD4/CD8 MicroBead для человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-122-352). Т-клетки разделяли на аликвоты и криоконсервировали для будущего применения в Cryostor® CS10 (StemCell Technologies, кат. № 07930).

После размораживания Т-клетки высевали с плотностью $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в среде для роста Т-клеток (TCGM), состоящей из CTS OpTmizer для размножения Т-клеток SFM и добавки для размножения Т-клеток (ThermoFisher кат. № A1048501), 5% сыворотки АВ человека (GeminiBio, кат. № 100-512) 1X пенициллин-стрептомицин, 1X GlutaMax, 10 мМ HEPES, 200 ед/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. № 200-15). Т-клетки выдерживали в этой среде в течение 24 часов, после чего их активировали реагентом Т-клетки TransAct™ для человека (Miltenyi, кат. № 130-111-160), добавленным в соотношении 1:100 по объему. Т-клетки активировали в течение 48 часов до обработки LNP.

Пример 19.2. Обработка и размножение Т-клеток

Через 48 часов после активации Т-клетки собирали, центрифугировали при 500 g в течение 5 мин и повторно суспендировали в концентрации $6,41 \times 10^5$ Т-клеток/мл в среде для посева Т-клеток (TCPM): версия без сыворотки TCGM, содержащая 400 ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. 200-02), 10 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. 200-07) и 10 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. 200-15). 50 мкл Т-клеток в TCPM ($3,2 \times 10^4$ Т-клеток) добавляли на лунку для обработки в плоскодонные 96-луночные планшеты.

LNP готовили, как описано в примере 1, в соотношении 50/38,5/10/1,5 (липид А/холестерин/DSPC/PEG2k-DMG). Перед обработкой Т-клетками две отдельные смеси LNP (обозначаемые ниже как смеси «А» и «В») получали в среде для обработки Т-клеток

(TCTM): версия TCGM, содержащая 20 мкг/мл ghApoE3, в отсутствие интерлейкинов 2, 15 или 7.

Смесь «А» состояла из LNP с G013006 (SEQ ID NO: 1), разбавленного до 13,36 мкг/мл, а смесь «В» состояла из LNP с Cas9 мРНК 60 (SEQ ID NO: 11), разбавленного до 13,36 мкг/мл. Смеси LNP «А» и «Б» инкубировали при 37°C в течение 15 минут. Смесь «А» серийно разбавляли 1:2 в TCTM и смешивали 1:1 по объему со смесью «В». 25 мкл полученного раствора добавляли к $3,2 \times 10^4$ Т-клеткам в 96-луночных планшетах.

Далее матрицу репарации в форме адено-ассоциированного вируса (AAV), кодирующего HD3 TCR (SEQ ID NO: 18, разводили в TCTM до $3,84 \times 10^{11}$ геномных копий/мл в присутствии или в отсутствие соединения 4, разведенного до 2 мкМ. 25 мкл полученного раствора добавляли к Т-клеткам, которые были обработаны LNP на предыдущей стадии. Для возможности оценки редактирования с помощью NGS без вмешательства матриц репарации в одно из плеч этого эксперимента в отсутствие AAV вводили 25 мкл TCTM с соединением 4 или без него, разбавленного до 2 мкМ.

После добавления LNP, матриц репарации и соединения 4 Т-клетки инкубировали при 37°C в течение 48 ч, после чего Т-клетки центрифугировали при 500 g в течение 5 мин, повторно суспендировали в 200 мкл TCGM и возвращали в инкубатор.

На 4-й день после обработки клетки, не получившие матрицы AAV, центрифугировали при 500 g в течение 5 мин, подвергали лизису, проводили ПЦР-амплификацию каждого целевого локуса и последующий NGS-анализ, как описано в примере 1. Результаты по процентному содержанию инделов приведены в таблице 21 и на фиг. 10А.

Также на 4-й день после обработки клетки, получившие матрицы AAV, смешивали и субкультивировали в соотношении 1:4 (об./об.) в TCGM. На 7-й день после обработки клетки, получившие матрицы AAV, оценивали с помощью проточной цитометрии.

Пример 19.3. Проточная цитометрия

На 7-й день после обработки LNP 50 мкл клеток переносили в 96-луночные планшеты с U-образным дном и центрифугировали в течение 5 мин при 500 g. Супернатант удаляли, клетки повторно суспендировали в 100 мкл буфера для FACS, содержащего Viakrome 808 (Beckman C., кат. C36628) (1:100), PC5.5 анти-CD3 (Biolegend, кат. 317336) (1:200), BV421 анти-CD4 (Biolegend, кат. 317434) (1:100), BV785 анти-CD8 (Biolegend, кат. 301046) (1:100) и анти-V β 7.2 (Beckman C., IM3604) (1:50) и окрашивали в течение 30 мин при 4°C в темноте. Клетки один раз промывали 200 мкл буфера FACS, повторно суспендировали в 100 мкл буфера FACS и обрабатывали на проточном цитометре Cytotflex LX. Результаты по процентному содержанию вставки HD3 TCR приведены в таблице 22 и на фиг. 10В.

Таблица 21. Процентное содержание индела в присутствии и без соединения 4.

огРНК (мкг/мл)	Spy Cas9+соединение 4		Spy Cas9 - соединение 4	
	Среднее значение	Ст. откл. %	Среднее значение	Ст. откл. %

	редактирования TRAC в %	редактирования TRAC	редактирования TRAC в %	редактирования TRAC
1,67	96,10	0,85	94,30	0,14
0,835	96,15	0,49	88,70	1,70
0,418	94,45	0,92	79,05	3,04
0,209	89,00	0,42	66,20	3,39
0,104	79,25	0,64	46,00	2,12
0,052	63,45	0,07	29,80	0,71
0,026	48,55	0,49	19,35	3,61
0	0,20	0,00	0,10	0,00

Таблица 22. Процент вставки HD3 TCR в присутствии или без соединения 4.

огРНК (мкг/мл)	Spy Cas9+соединение 4		Spy Cas9 - соединение 4	
	Среднее значение CD3 ⁺ Vβ7.2 ⁺ Т-клетки %	Ст. откл. CD3 ⁺ Vβ7.2 ⁺ Т-клетки %	Среднее значение CD3 ⁺ Vβ7.2 ⁺ Т-клетки %	Ст. откл. CD3 ⁺ Vβ7.2 ⁺ Т-клетки %
	1,67	49,65	2,47	34,10
0,835	53,30	2,26	31,95	1,20
0,418	53,80	3,96	24,85	0,35
0,209	56,10	2,69	16,30	0,28
0,104	52,60	4,95	10,20	0,00
0,052	44,50	4,95	5,54	0,43
0,026	35,20	5,37	3,67	0,50
0	0,79	0,08	0,65	0,14

Таблица дополнительных последовательностей

В следующей таблице и далее термины «mA», «mC», «mU» или «mG» используются для обозначения нуклеотида, модифицированного 2'-O-Me.

В следующей таблице «*» используется для обозначения модификации PS. В данной заявке термины A*, C*, U* или G* могут использоваться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом PS-связью.

Понятно, что если последовательность ДНК (содержащая T) упоминается относительно РНК, то T следует заменить на U (которые могут быть модифицированы или немодифицированы в зависимости от контекста), и наоборот.

В следующей таблице для обозначения пептидных последовательностей используется однобуквенный код аминокислоты.

Описание	SEQ ID NO	Последовательность
----------	-----------	--------------------

G013006	1	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU
G016239	2	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU
G000529	3	mG*mG*mC*CACGGAGCGAGACAUCUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU
G013676	4	mU*mG*mG*UCAGGGCAAGAGCUAUUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU
G018995	5	mA*mC*mA*GCGACGCCGCGAGCCAGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU
G000562	6	mC*mC*mA*AUAUCAGGAGACUAGGAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU
tracrPHK	7	AACAGCAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU
Аминокис лотная	8	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY

последовательность рекомбинантного Cas9-NLS		<p>LQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS GVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDLNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGA SQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYY VGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSF IERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYEFTVYNELTKVKYVT EGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKR RRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAK KGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKG QKNSRERMKRIEELGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDN KVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT QRKFDNLTKAERGGELSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQI LDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVGTAALIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFA TVRKVLSMPQVNIV KKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFD SPTVAYSVLVVAKVEKGGKSKLKS VKELLGITIMERSSEFEK NPIDFLEAKGYKEVKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASA GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQL FVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHR DKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFYFDTTIDRKRYTSTK EVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV</p>
ORF, кодирующая Sp.	9	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAC AAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACA AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACA</p>

Cas9	GACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC TGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACG AAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTG GAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGA AAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCG CATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGA AAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAG ACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAG AGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACA ACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAG ACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGC AAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGAC TGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG CTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCT GATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGA GCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTG AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGG CAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGAC ATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCT GAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACC AGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAG CTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAG CAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAA GCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTG GAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTTCG ACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAA CTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCC GTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCC TGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAA GAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGT
------	---

CGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAA
TGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTC
CTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTC
TACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAGG
AATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGA
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAG
GTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAA
GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG
AAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGAC
CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAA
CGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGA
CACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAA
AGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGT
CATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGG
GGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGA
GCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATC
CACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAA
GGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC
ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAG
GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGT
CAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCA
TCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGG
ACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAA
GAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGA
ACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGC
TGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTAC
GTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTA
CGACGTCGACCACATCGTCCCAGAGCTTCCTGAAGG
ACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGAC
AAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAG
AAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTG
CTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAA
CCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTG
GACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTTCGAAAC

AAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACA
GCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG
ATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCT
GGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGT
CAGAGAAATCAACA ACTACCACCACGCACACGACGCAT
ACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAG
TACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTA
CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTC
TACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCAC
ACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG
AAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAA
GGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCA
TGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAG
ACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG
AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGG
GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGT
CGCATAACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGG
GAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTG
GGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAA
CCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAG
TCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGC
CTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGC
AAGCGCAGGAGA ACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCA
CTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGC
CACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG
AACAGAAGCAGCTGTTCGTGCAACAGCACAAGCACTAC
CTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAA
GAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCC
TGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGA
GAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGAC
AAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA
CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGA
AGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAG
GACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGA

		GGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGG TCTAG
ORF, кодирую щая Sp. Cas9	10	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCAC CAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACA AGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACC GACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCT GCTGTTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGC TGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAG AACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAG ATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAG GAGTCCTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCG GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTA CCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGA AGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTG ATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGC CACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCC GACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTAC AACAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGG CGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCC GGCTGTCCAA GTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCCG GCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCC CTGTCCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACCTTC GACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGA CACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGA TCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGA ACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGG TGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCTCCA TGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACC CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAA GTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCT ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCTCCCAGGAGGAG TTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGAC GGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGA CCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCA TCCCCACAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCC

TGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGAC
AACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGAT
CCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCG
GTTCGCCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCA
CCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCC
TCCGCCAGTCCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGAC
AAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACTC
CCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGAC
CAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCG
CCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGAC
CTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCA
GCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCG
ACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC
GCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATC
AAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGG
ACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTAC
GCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAA
GCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGA
AGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAG
ACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAAC
CGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACC
TTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCA
GGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCG
GCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTG
AAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCA
CAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGA
ACCAGACCACCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGAG
CGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGG
CTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCC
AGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG
AACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACAT
CAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCC
CCAGTCCTTCCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGT
GCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACA

ACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAC
TACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCA
GCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGG
CAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGC
CCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACG
AGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACC
CTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTC
CAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCA
CGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCG
CCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTC
GTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGAT
GATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCG
CCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTCTTCA
AGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAG
CGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAT
CGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGA
AGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAG
ACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCAT
CCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGA
AGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGAC
TCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAG
GTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAA
GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTCTT
CGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCC
AAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCG
GATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACG
AGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCTGTACC
TGGCCTCCCACCTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAG
GACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAA
GCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTT
CTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACA
AGGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCC
ATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTAC

		<p>CCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTT CGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATC ACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTG GGCGGCGACGGCGGGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAA GGTGTGA</p>
<p>Открытая рамка считыван ия Cas9 с меткой Hibit</p>	<p>11</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCA CCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUA CAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAAC ACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGC CCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCC GGCUGAAGCGGACCGCCCGGGCGGGUACACCCGGCGG AAGAACCGBAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCA ACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCG GCUGGAGGAGUCCUUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAG CACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGA GGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAUCUACCACC UGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGA CCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCUUGGCCACAUGAUC AGUUCGGGGCCACUUCUGAUCGAGGGCGACCUGAA CCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACC CAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGU CCGCCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGGCGGCUGGAGAACCUG AUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGU UCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCUGGGCCUGACCCCC AACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCA AGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCG ACCUGUUCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUC CUGCUGUCCGACAUCUGCGGGUGAACACCGAGAUCA CCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUAC GACGAGCACCACGAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCU GGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUC UUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACA</p>

UCGACGGCGGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUU
CAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAG
GAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGC
GGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCAC
CAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGGC
GCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGG
GAGAAGAUCGAGAAGAUCUGACCUUCCGGAUCCCU
ACUACGUGGGCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUC
GCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCC
CUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCC
GCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACA
AGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCC
CUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGA
CCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCC
CGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUUCGUG
GACCUGCUGUUAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGA
AGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUG
CUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGG
UUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAA
GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAG
AACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGA
CCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCU
GAAGACCUACGCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUG
AAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCC
GGCUGUCCCGGAAGCUGAUAACGGCAUCCGGGACAA
GCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCCUGAAGUCC
GACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCC
ACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAA
GGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGC
ACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAG
GGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGG
UGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGU
GAUCGAGAUGGCCCGGAGAACAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCG
AGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCAGAUCCUGAA

GGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAG
AAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACA
UGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUC
CGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUC
UGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCG
GUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCC
UCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGC
GGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAA
GUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUG
UCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGC
UGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGCCCA
GAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAG
AACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCC
UGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCGGGAAGGACUU
CCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUAACAACUACCAC
CACGCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCAC
CGCCCUGAUAAGAAGUACCCAAGCUGGAGUCCGAG
UUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGA
AGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCCGGCAAGGC
CACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACU
UCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAU
CCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCG
GCGAGAUUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCAC
CGUGC GGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUC
GUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCA
AGGAGUCCAUCCUGCCAAGCGGAACUCCGACAAGCU
GAUCGCCC GGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUAC
GGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCU
GGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAG
CUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCA
UGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCAUCGACUU
CCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGAC
CUGAUAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGC
UGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGG
CGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUCCGUCCA

		<p>AGUACGUGAACUUCUGUACCUGGCCUCCCACUACGA GAAGCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACGAGCAGAAG CAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCACUACCUGGACG AGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCAAGCGGGU GAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCC GCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCAUCCGGGAGCA GGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCUGACCAACC UGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACC AUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGC UGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUG UACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCAGCUGGGCGGGCG ACGGCGGGCGGCUCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUC CGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGGCGGC UGUUCAAGAAGAUCUCCUGA</p>
<p>Вставка TCR HD1, включая ITR</p>	<p>12</p>	<p>ttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgagggcgaccgacaaaggctgccc gacgcccgggctttgccggggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgacagaggggagt ggccaactccatcactaggggttctagatcttgccaacatacataaacctcccattctgcta atgccagcctaagttgggggagaccactccagattccaagatgtacagtttgctttgctgggc cttttcccatgctgccttactctgccagagttatattgctgggggtttgaagaagatcctattaa ataaaagaataagcagttattattaagtagccctgcatttcagggttcttgagtggcaggccag gcctggcctgaacgttactgaaatcatggcctcttgccaagattgatagcttgctcctgctc cctgagtcaccagtcacagcagctggtttctaagatgctatttcccgataaagcatgag accgtgacttgccagccccacagagccccgccctgtccatcactggcatctggactccagc ctggggtggggcaagagggaaatgagatcatgtcctaaccctgatcctcttgcccacagat atccagaacctgacctgcggctccggtgccgtagtggcagagcgcacatcgccea cagtccccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggc gctgggtgaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcttttcccgaggggtggggga gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacggggttgccgccagaa cacaggtaatgcccgtgtgtgttcccgcggcctggcctctttacgggttatggccttgctg gccttgaattactccacgccctggctgcagtagctgattctgatcccagcttcgggttgga agtgggtgggagagttcagggccttgccttaaggagcccccttcgctcgtgcttgagttgag gcctggcttggcgctggggccgccgctgcgaatctggtggcaccttcgcgctgtctcg ctgcttcgataagtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaa gatagcttgtaaagcgggccaagatgtgcacactggtatttcgggttttggggccgcgggc ggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgagggggcctgcgagcgc</p>

	<p>ggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcct cgcgccgccgtgfatcggccggcctggcggcaaggctggccggcggcaccagttgc gtgagcggaaagatggccgcttccggcctgctgcaggagctcaaatggaggacgcg gcgctcgggagagcgggggggtgagtcacccacacaaaggaaaaggccttccgctctc agccgtcgttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagtctc gagcttttgagtagctcgtcttttaggtggggggagggtttatgcgatggagtccccac actgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttgaattgc ccttttgagtttgatcttggtcattctcaagcctcagacagtgggtcaaaagtttttctccattt caggtgtcgtgatcggccgccaccatgggatcttggacactgtgttgctgtccctgtgat cctggtggccaagcacacagatgccggcgtgatccagtctcctagacacgaagtaccgag atgggccaagaagtgacctgcgctgcaagcctatcagcggccacgattacctgttctggtgta cagacagaccatgatgagaggcctggaactgctgatctacttcaacaacaacgtgccccatcg acgacagcggcatgcccaggatagattcagcggcaagatgccaacgccagcttcagca ccctgaagatccagcctagcagcccagagatagcggcgtgacttctgcgccagcagaaa gacaggcggctacagcaatcagccccagcactttggagatggcaccggctgagcatcctg gaagatctgaagaacgtgtccacctgaggtggcgtgttcgagccttctgaggccgagat cagccacacacagaaagccacactcgtgtgtctggccaccggcttctatcccgatcacgtgg aactgtcttgggtggaacggcaagagggtcacagcggcgtcagcaccgatcctcagcc tctgaaagagcagcccgtctgaacgacagcagatactgcctgagcagcagactgagagt tccgccaccttctggcagaaccccagaaaccacttcagatgccaggtgcagttctacggcct gagcagaaacgatgagtgaccaggatagagccaagcctgtgacacagatcgtgtctgc cgaagcctggggcagagccgattgtggctttaccagcagagctaccagcaggcgtgct gtctgccacaatctgtacgagatcctgctgggcaaaagccactctgtacgccgtgctggtgc tgcctggtgctgatggccatggtcaagcggagatagcagggcggctccgggtgccac aaacttctccctgctcaagcagggcggagatgtggaagagaacctggccctatggaaacc ctgctgaagtgctgagcggcacactgctgtggcagctgacatgggtccgatctcagcagc ctgtgcagctcctcagccgtgattctgagagaaggcaggacgccgtgatcaactgcagc agcttaaggccctgtacagcgtgactggtacagacagaagcacggcgaggccctgtgt tctgatgatcctgctgaaaggcggcgagcagaaggccacgagaagatcagcggcagct tcaacgagaagaagcagcagctccagcctgtacctgacagccagccagctgagctacagcg gcacctactttgtggcaccgctggatcaacgactacaagctgtcttccggagccggcacca cagtgacagtggggccaatattcagaaccccgatcctgccgtgaccagctgagagacag caagagcagcgacaagagcgtgtgctgttaccgacttcgacagccagaccaacgtgtcc cagagcaaggacagcagcgtgtacatcaccgataagactgtgctggacatcgggagcatg gacttcaagagcaacagcggcgtggcctgtccaacaagagcgatttcgctgcgccaacg</p>
--	--

		<p>ccttcaacaacagcattatccccgaggacacattcttccaagtctgagagcagctgcgacg tgaagctggtggaaaagagcttcgagacagacaccaacctgaactccagaacctgagcgt gateggctcagaatcctgctgctcaaggtggccggcttaacctgctgatgacctgagact gtgtccagtaacctCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT GTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAG GTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAA TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGG GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCT CTATGGcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggatccccactagtc gtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgctgctattcaccgattttgattct caaacaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtatatacacagacaaaactgtgctagaca tgaggtctatggactcaagagcaacagtctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcat gtgcaaacgcctcaacaacagcattattccagaagacaccttctccccagcccagtaagg gcagctttggtgccttcgcaggctgttcttctcaggaatggccaggttctgccagagct ctggcaatgatgtctaaaactcctctgattggtgctcggccttatccattgccacaaaacc ctcttttactaagaaacagtgagcctgttctggcagtcagagaatgacacgggaaaaaag cagatgaagagaaggtggcaggagagggcacgtggcccagcctcagctctagatctagg aacccctagtgatggagttggccactcctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcc cgggcaaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcggccgctcagtgagcgagcgagc gcgagagagggagtgccaa</p>
pINT-2547	13	<p>taatcagaattggttaattggtgtaacattattcagattgggcttgattaaaaactcatttttaattt aaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttcg ttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcg cgtaatctgctgctgcaaacaaaaaaaccaccgtaccagcgggtggtttgttccggatca agagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactggt cttctagtgtagccgtagttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcg ctctgctaactctgtaccagtggtgctgccagtgccgataagtcgtgcttaccgggttga ctcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcac acagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatactacagcgtgagctatga gaaagcggcagcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcaggggt cggaacaggagagcgcacgagggagctccaggggaaacgcctggtatctttatagtcct gtcgggttccgacctctgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcaggggggaggc ctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttctgacctttgctggcctttgctca catgttcttctgcgttatcccctgattctgtgataaccgtattaccgctttgagtgagctgat</p>

accgctcggcgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcggaggaagcgggaag
agcgcccaatacgc aaaccgctctccccgcgcgttgccgattcattaatgcagctggcac
gacaggttccccgactggaaagcgggcagtgagcgcacgcaattaatgtgagftagctcac
tcattaggcaccgccagctttacactttatgcttccggctcgtatggtgtggaattgtgagcgg
ataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacaccacgcgtTTGGCCACT
CCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA
CCAAAGGTTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC
CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA
ACTCCATCACTAGGGGTTCCCTagatcttccaacataccataaacctcca
ttctgtaatgcccagcctaagttggggagaccactccagattccaagatgtacagtttgcttg
ctgggccttttcccagctgccttactctgccagagttatattgctggggtttgaagaagatc
ctattaaataaaagaataagcagttattattaagtagccctgcatttcaggtttccctgagtgccag
gccaggcctggccgtgaacgttcaactgaaatcatggcctcttgccaagattgatagcttg
cctgtccctgagtcccagtcacacgagcagctggttctaaagatgctatttccgtataaagc
atgagaccgtgacttcccagccccacagagccccgccctgtccatcactggaatctggact
ccagcctgggttggggcaagaggaaatgagatcatgtcctaaccctgatcctcttgcceca
cagATATCCAGAACCCTGACCCTGCcGAGGGCCGCGGCAG
CCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAAcCCCGCCCC
CATGgtgAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGT
GCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCC
ACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC
ACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC
GGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACC
CTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC
GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCG
AGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAA
GCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCAT
GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCA
AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC
GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGG
CCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCA
GTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC

ACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCA
 CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAcctCGACTGTG
 CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCG
 TGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGTCC
 TTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA
 GTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAG
 GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGC
 ATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGcttctgaggcgaaagaa
 ccagctggggctctagggggtatecccACTAGTCGTGTACCAGCTGAG
 AGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTAC
 CGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGA
 TTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACAT
 GAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCT
 GGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCA
 ACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCC
 CAGgtaaggcagctttggtgccttcgcaggctgttccctgcttcaggaatggccaggttct
 gccagagctctggtcaatgatgtctaaaactcctctgattggtggtctcggccttatccattgc
 caccaaaacctcttttactaagaacagtgagccttgttctggcagtcagagaatgacacg
 ggaaaaagcagatgaagagaaggtggcaggagaggccacgtggcccagcctcagctc
 tAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC
 TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA
 AAGCCC GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCA
 GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAgaatt
 ctctggccgtcgtttfacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttaccacactaatgcctt
 gcagcacatcccccttgcagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatgcctt
 cccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgatct
 gtgcggtatttcacaccgatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagftaa
 gccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctcccgg
 catccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgcagaggtttaccgt
 catcaccgaaacgcgcgatgcagctctggcccgtgtctcaaaatctctgatgttacattgcaca
 agataaaaatatacatcatgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggt
 gttatgagccatattcaacgggaaacgtcaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatt
 tataatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgttga
 tgggaagcccgatgcgccagagttgttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgt
 tacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcat

		<p>ttatccgtactcctgatgatgcattggtactcaccactgcgatccccggaaaacagcattcca ggatfagaagaatcctgattcaggtgaaaatattgtgatgcgctggcagtgctcctgcgcc ggttgcatcgaattcctgttgaattgcctfttaacagcgatcgcgatttcgtctcgtcaggc gcaatcacgaatgaataacggttgggtgatgcagtgatttgatgacgagcgtaatggctgg cctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaactttgccattctcaccggattcagtcgtcac tcatggtgatttctcacttgataaccttattttgacgaggggaaattaataggtgtattgatgtg gacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgcacatctatggaactgcctcggtgag ttttctcctcattacagaaacggcttttcaaaaatattggtattgataatcctgatafataaattg cagtttcatttgatgctcgaatgatttttc</p>
<p>pINT 1405, Вставка TCR HD1, включая ITR</p>	<p>14</p>	<p>ttggcactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgagggccggcgacaaaaggctgccc gacggccgggctttgcccggcggcctcagtgagcgagcgcgcagagagggagt ggccaactccatcactaggggtcctagatcttgccaacatacfaaacctcccattctgcta atgcccagcctaagttggggagaccactccagattccaagatgtacagtttctttgctgggc cttttcccatgcctgccttactctgccagagttatattgctgggggtttgaagaagatcattaa ataaaagaataagcagttatttaagtagccctgcatttcaggtttccttgatggcaggccag gcctggccgtgaacgttactgaaatcatggcctcttgccaagattgatagcttgcctgctc cctgagtcaccagtcacacgagcagctggttctaaatgctatttccgtataaagcatgag accgtgacttgccagccccacagagccccgccctgtccatcactggcatctggactccagc ctgggttggggcaaaagagggaaatgagatcatgtcctaacctgatcctcttgcacacagat atccagaacctgacctgcggctccgggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgecca cagtccccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaaccggctcctagagaaggtggc gccccgtaaaactgggaaagtgatgctgtgactggctccgcttttcccagggtggggga gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttgcacgggttggccagaa cacaggtaagtgcctgtgtgttcccggggcctggcctctttacgggttatggccttgcgt gccttgaacttccacgccctggctgcagtagctgattctgatccgagcttcgggttggg agtgggtgggagagttcaggccttgccttaaggagcccccttgcctcgtgcttgattgag gcctggcttgggcgctggggccgccgctgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctc ctgcttgcataagtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaa gatagcttftaaatcggggccaagatgtgcacactggtatttcggttttggggccgcgggc ggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgc ggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgctggcct cgcgccgccgtgtatcggcccgcctgggcggcaaggctggcccggctggcaccagttgc gtgagcggaaagatggccgcttcccggcctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcg gcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaaggccttccgtctc agccgtcgttcatgtgactccacggagtagccggcgccgtccaggcacctcgattagtctc</p>

gagcttttgagtagctcgtctttaggtggggggaggggtttatgcatggagttccccac
 actgagtggggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttgaatttgc
 ccttttgagtttgatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttcttcattt
 caggtgtcgtgatcggccgccaccatgggatcttggacactgtgttgcgtgcccctgtgcat
 cctggtggccaagcacacagatgccggcgtgatccagtctcctagacacgaagtgaccgag
 atgggccaagaagtgaccctgcgctgcaagcctatcagcggccacgattacctgttctggta
 cagacagaccatgatgagaggcctggaactgctgatctactcaacaacaacgtgcccacg
 acgacagcggcatgccgaggatagattcagcggcaagatgcccaacgccagcttcagca
 ccctgaagatccagcctagcagcccagagatagcggcgtgacttctgcgccagcagaaa
 gacagcggctacagcaatcagccccagcactttggagatggcaccggctgagcatcctg
 gaagatctgaagaacgtgtccacctgaggtggccgtgttcgagcctctgagggccagat
 cagccacacacagaaagccacactcgtgtgtctggccaccggcttctatcccgatcacgtgg
 aactgtcttgggggtcaacggcaagaggtgcacagcggcgtcagcaccgatcctcagcc
 tctgaaagagcagcccgtctgaacgacagcagatactgcctgagcagcagactgagagtg
 tccgccaccttctggcagaacccagaaaccacttcagatgccaggtgcagtctacggcct
 gagcgagaacgatgagtgaccaggatagagccaagcctgtgacacagatcgtgtctgc
 cgaagcctggggcagagccgattgtggcttaccagcagagctaccagcagggcgtgct
 gtctgccacaatcctgtacgagatcctgctgggcaaaagccactctgtacgccgtgctggtgct
 tggcctggtgctgatggccatggtcaagcggaggatagcagggcggctccgggtgccac
 aaacttctccctgctcaagcagggcggagatgtggaagagaaccctggccctatggaaacc
 ctgctgaaggtgctgagcggcacactcgtgtggcagctgacatgggtccgatctcagcagc
 ctgtgagctcctcagggcgtgattctgagagaaggcaggacgccgtgatcaactgcagc
 agctctaaggccctgtacagcgtgcaactggtacagacagaagcacggcgaggccctgtgt
 tctgatgatcctgctgaaaggcggcgagcagaaggccacgagaagatcagcggcagct
 tcaacgagaagaagcagcagctccagcctgtacctgacagccagccagctgagctacagcg
 gcacctacttttggcaccgcctggatcaacgactacaagctgtctttcggagccggcacca
 cagtgacagtgcgggccaatattcagaaccccgatcctgccgtgtaccagctgagagacag
 caagagcagcgacaagagcgtgtgcctgttcaccgacttcgacagccagaccaacgtgtcc
 cagagcaaggacagcagcgtgtacatcaccgataagactgtgctggacatcgggagcatg
 gacttcaagagcaacagcggcgtggcctggtccaacaagagcgaatttcgctgcgccaacg
 ccttcaacaacagcattatccccgaggacacatttcccaagtctgagagcagctgcgacg
 tgaagctggtggaaaagagcttcgagacagacaccaacctgaactccagaacctgagcgt
 gatcggcttcagaatcctgctgctcaaggtggccggcttcaacctgctgatgacctgagact
 gtggtccagetaacctCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT
 GTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAG

		<p>GTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGG GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCT CTATGGcttctgaggeggaaagaaccagctggggctctaggggatccccactagtc gtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagctgtctgcctattcaccgatttgattct caaacaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatcacagacaaaactgtgctagaca tgaggtctatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatgactttgcat gtgcaaacgccttcaacaacagcattatccagaagacaccttcttcccagcccaggttaagg gcagcttgggtgccttcgcaggctgttcttcttcagggaatggccaggttctgccagagct ctggctaatgatgtctaaaactcctctgattgggtgctcggccttatccattgccacaaaacc ctcttttactaagaacagtgagcctgttctggcagtcagagaatgacacgggaaaaaag cagatgaagagaaggtggcaggagaggacgtggcccagcctcagctctagatctagg aacccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcc cgggcaaagcccgggcgtcgggcgaccttggctgcccggcctcagtgagcgagcgagc gcgcagagagggagtgccaa</p>
<p>AAV6- 1008 вставка GFP для AAVS1</p>	<p>15</p>	<p>tgcacatcaccgttttctggacaaccccaaagtaccccgctccctggctttagccacctctc cactctcttcttcttgcctggacaccccgttctcctgtggattcgggtcacctctcactccttc atttgggcagctccctaccccccttacctctctagctgtgtgtagctcttccagccccctgcat ggcatcttccaggggtccgagagctcagctagcttcttctccaacccgggcccctatgtcc acttcaggacagcatgttctgcctccaggatcctgtgtccccgagctgggaccacctata ttcccaggccggtaagtggctctggttctgggtacttttatctgtcccctccaccccacagt ggggccactagggacaggattggtgacagaaaagccccatccttaggctcctccttccga gtaattcatacaaaaggactcggccctgccttggggaatccagggaccgtcgttaactccc actaacgtagaacccagagatcgtcgttcccggcccctcaccgcccgtctcgtcatca ctgaggtggagaagagcatcgtgaggtccgggtcccgtcagtgggcagagcgcacatc gcccacagctcccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaag gtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccagggtg ggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggttggccg ccagaacacaggttaagtccgtgtgtggtcccgcggcctggcctctttacgggttatggcc cttgcgtgccttgaattacttccacggccctggctgcagtagctgattcttgatcccagcttccg ggttggaaagtgggtgggagagttcaggccttgcgcttaaggagcccccttgcctcgtgctt gagttgaggcctggcttgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctgggtggcaccttgcgc ctgtctcgtccttgcgataagtctctagccattfaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttt ctggcaagatagcttgaatgcgggccaacatctgcacactggtatttcggttttggggcc</p>

gcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgc
 gaggcggccaccgagaatcggacggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgc
 ctggcctcgcgccgccgtgtatcccccgccctggcgggcaaggctggcccggtcggcac
 cagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcaggagctcaaaatggag
 gacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcaccacacaaaggaaaaggccttfc
 cgtcctcagccgctcgttcatgtgactccacggagtaccggcgccgtccaggcacctcga
 tagttctcagacttttgagtagctcgtcttttaggttggggggagggttttatgcgatggagttt
 cccacactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctcctgg
 aatttgcctttttgagtttgatcttggtcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttct
 tccatttcaggtgtcgtgacgctagcgtaccggactcaatctcagactcaagcttcgaattct
 gcagtcgacggtaccgcgggcccgggatccaccggtcgccaccatggtgAGCAAG
 GGCGAGGAGCTGTTACCCGGGTGGTGCCCATCCTGGTC
 GAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT
 GTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC
 TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCG
 TGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCG
 TGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGC
 ACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
 AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC
 AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCT
 GGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG
 AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC
 TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA
 GAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACA
 ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTAC
 CAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCT
 GCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGA
 GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTG
 CTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATG
 GACGAGCTGTACAAGtaatagcggcgegactctagatcataatcagccatac
 cacattttagaggttttactgcttfaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacata
 aatgaatgcaattgttgttgaactgtttattgcagcttataatggtacaataaagaatag
 catcacaattcacaataaagcatttttactgcattctagttgtggtttgccaactcatca
 atgtatcttaaggcgttagtctcctgatattgggtctaacccccacctcctgttaggcagattcctt
 atctggtgacacacccccatttctggagccatctctccttgcagaaccttaaggtttgctt

		<p>acgatggagccagagaggatcctgggagggagagctggcagggggtgggaggggaagg gggggatgctgacctgccccggtctcagtgccaccctgcgctaccctctcccagaacctg agctgctctgacgcggccgtctggtgcgttctactgatcctggtgctgcagcttcttacactc ccaagaggagaagcagtttgaaaaacaaaatcagaataagttggtcctgagtttaactttg gctcttcaccttctagtccccaatftatattgttctcctcctgctgcagttttacctgtgagataagg ccagtagccagccccgt</p>
<p>AAV6-231 вставка GFP для AAVS1</p>	<p>16</p>	<p>gaccactttgagctctactggcttctgcgccgectctggcccactgtttcccctcccaggcag gtcctgctttctctgacctgcattctctcccctgggctgtgccgcttctgtctgcagcttgggc ctgggtcacctctacggctggcccagatccttccctgccgctcctcaggttccgtcttctcc actccccttcccctgctctctgctgtgttctgcccaggatgctcttccggagcacttcttc tcggcgtgcaccacgtgatgtcctctgagcggatcctcccctgtctgggtcctctccgggc atctctctcccctacccaacccatgccgttctactcgtgggttccccttctctctctctg gggctgtgccatctctctgttcttaggatggccttctccgacggatgtctcccctgctcccgc ctccccttctgtaggcctgcatcatcaccgtttctggacaacccaaagtaccccgtctccct ggctttagccacctctccatcctcttcttcttctgctggacaccccgttctctgtggattcgg gtcacctctactccttctcattgggcagctcccctacccccctacctctctagctctgtctagct cttccagccccctgtcatggcatctccaggggtccgagagctcagctagcttcttctccaa cccggccccctatgtccacttcaggacagcatgttctgctcctccagggatcctgtgtccccg agctgggaccacttatattcccagggccggtaatgtggctctggtctcgggtactttatctgt cccctccaccccacagtggggccactagggacaggattgggtgacagaaaagccccatcctt aggcctcctccttagttattaatgagtaattcatacaaaaggactcggccctgccttggggaatc ccagggaccgtctgtaaacctcccactaacgtagaaccagagatcgtctgcttcccgcctcc tcacccgcccgtctctgctatcactgaggtggagaagagcatgcgtgaggctccggtgcc gtcagtgggcagagcgcacatcggccacagctcccgagaagttggggggaggggtcggc aattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaactgggaaagtgatgtctgtact ggctccgcttttcccagggtgggggagaaccgtatataagtcagtagtcgccgtgaaac gttcttttgcacagggttggccgacagacaggttaagtccgtgtgtgttcccgcggg cctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattactccacgccccctggctgagt acgtgattcttgatcccagcttccgggtggaagtgggtgggagagttcagggccttgcgctt aaggagcccccttgcctcgtgctttagttgaggcctggcttgggcgctggggccgccgct gcgaatctggtggcaccttgcgectgtctcgtctgttctgataagtctctagccattfaaattt ttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagcttgtaaatcggggccaaCatctgc acactggtatttctgttttggggccgcggggggcagggggcccgtgctcccagcgcac atgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagctc aagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgctgtatcccccgcccctgggc</p>

	<p> ggcaaggctggccccggcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccc tgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcggcggggtgagtcac ccacacaaaggaaaaggccfttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtac cgggcgccgtccaggcacctcgattagtctcgagcttttgagtagtcgctcttttaggtggg gggaggggtttatgcgatggagtftccccacactgagtggggtggagactgaagftaggcca gcttggcacttgatgtaattctccttgaatttgcctttttgagtttgatcttggttcattctcaag cctcagacagtgggtcaaaagtfttttcttccatttcaggtgctgtgacgctagegctaccggact caatctgagctcaagcttcaattctgcagtcgacggtaccgcgggcccgggatccaccg gtcggcaccATGgtgAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGG GTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAA CGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCG ATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA CCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGA CCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACC CCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCA TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGC ACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTAT ATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGC AGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGC GACGGCCCCGTGCTGCTGCCCAGCAACCACTACCTGAGC ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCG CGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAtagcggc cgcgactctagatcataatcagccataccacattgtagaggtttacttgcttataaaacctcc cacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttaactgtttattgcag cttataatggtfacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcatttttactgca ttctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaaggcgtgtctaacccccacctctgtta ggcagattcctfatctggtgacacacccccatttctggagccatctctctccttgcagaacct ctaaggtttgcttacgatggagccagagaggatcctgggaggggagagcttggcaggggggtg ggaggggaaggggggatgcgtgacctgcccgttctcagtgccaccctgcgctaccctct cccagaacctgagctgctctgacgcggccgtctggtgcgttactgatcctggtgctgcagc </p>
--	--

		<p> ttccttacacttccaagaggagaagcagtttgaaaaacaaaatcagaataagttggctctga gttctaactttggetcttcaccttttagtccccaatttatattgttctccgtgcgtcagttttacctg tgagataaggccagtagccagccccgtctggcagggctgtggtgaggaggggggtgccc gtgtgaaaaactccctttgtgagaatggtgcgtcctaggtgttaccaggtcgtggccgctct actccctttctcttccatccttcttcttaaagagtccccagtctatctgggacatattcctc cgtccagagcaggggtcccgttccttaaggccctgctctgggcttctgggtttgagtccttgg caagcccaggagaggegetcaggttccctgtccccctctctgtccaccatctcatgcccct ggctctctgcccccttccctacaggggttctggctctgctcttcagactgagccccgttcccct geatccccgttcccctgcatcccccttcccctgcatccccagaggccccagggccactactt ggctggacccacgagaggccacccagccctgtctaccaggtgccttttgggtggatc tctccaa </p>
<p> Полная матрица МГРТ - вставка GFP T2A GFP: P00894 </p>	<p>17</p>	<p> GAGGGCCGCGGCAGCCTGCTGACCTGCGGGCGACGTGGA GGAGAAatCCCGGCCCATGgtgAGCAAGGGCGAGGAGCT GTTCACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGG CGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCC ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTC AGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTC AAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCAC CATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCG CCGAGGTGAAGTTCGAGGGGCGACACCCTGGTGAACCGC ATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA CATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCC ACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACA CCCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACC ACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCC AACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGT GACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGT ACAAGTAAcctCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT GTTGTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAG GTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAA TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGG </p>

		<p>GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCT CTATGGcttctgaggecgaaagaaccagctggggctctaggggtatccccACTA GTCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAA GTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAAT GTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC AAAACGTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAG CAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGC ATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAG ACACCTTCTTCCCAGCCCAGgtaagggcagctttggtgccttcgagge tgtttcttgcctcaggaatggccaggttctgccagagctctggtcaatgatgtctaaaactct ctgattggtggtctcggccttatccattgccacaaaaccctcttttactaagaacagtgagc cttggttctggcagtcagagaatgacacgggaaaaaagcagatgaagagaaggtggcagg agagggcacgtggcccagcctcagtctct</p>
<p>pINT 1280, Вставка TCR HD3, включая ITR</p>	<p>18</p>	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTagatcttccaacat accataaacctcccattctgctaagcccagcctaagtggggagaccactccagattccaag atgtacagtttgcttctggtggccttttcccatgcctgccttactctgccagagttatattgctgg ggtttgaagaagatcctattaataaaagaataagcagattattaagtagccctgcatttcag gtttccttgagtggcaggecagcctggcctgaacgttactgaaatcatggcctcttgccc aagattgatagcttctgctgtccctgagtcaccagtcacacagcagctggtttctaagatg ctatttcccgtataaagcatgagaccgtgacttgcagccccacagagccccgcccttgc tactggcatctggactccagcctgggttggggcaaagagggaaatgagatcatgtcctaac cctgatcctcttgtcccacagATATCCAGAACCCTGACCCTGCGGCT CCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACA GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAA GTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTG GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAAC GTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTA AGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACG GGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCC CTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT</p>

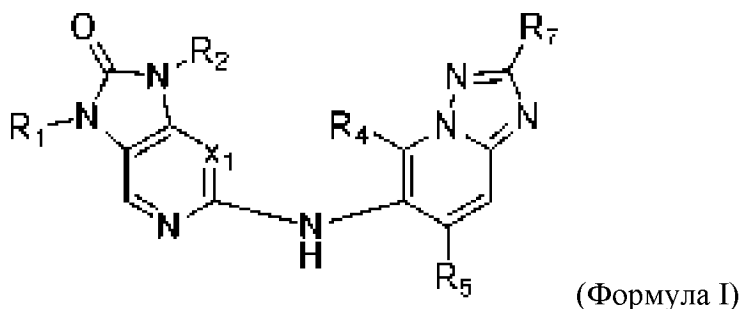
TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAG
GAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTG
GGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTC
GCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTA
AAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAA
GATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATgTGCACACTGGT
ATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCCTG
GCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCG
AGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG
CTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGT
GTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCG
GCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGG
CCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCT
CGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAA
AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTC
CACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT
CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGGA
GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGT
GGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATT
CTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTC
ATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTC
CATTTTCAGGTGTCGTGAtg^{cgg}CCGCCACCATGGGATGTA
GACTTCTGTGTTGCGCCGTGCTGTGTCTGCTTGGAGCTG
GCGAACTGGTGCCTATGGAAACCGGCGTGACCCAGACA
CCTAGACACCTGGTCATGGGCATGACAAACAAGAAAAG
CCTGAAGTGCGAGCAGCACCTGGGCCACAATGCCATGT
ACTGGTACAAGCAGAGCGCCAAGAAACCCCTGGAAGTGT
ATGTTTCGTGTACAGCCTGGAAGAGAGGGTCGAGAACA
CAGCGTGCCAGCAGATTCAGCCCTGAGTGCCCTAATAG
CAGCCACCTGTTTCTGCATCTGCACACCCTGCAGCCTGA
GGACTCTGCCCTGTATCTGTGTGCCAGCAGCCAGGACTA
CCTGGTGTCCAACGAGAAGCTGTTCTTCGGCAGCGGCAC
ACAGCTGAGCGTGCTGGAAGATCTGAAGAACGTGTTCC
CACCTGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGA
TCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCC

ACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGTGTCTTGGTGG
GTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACCGA
TCCTCAGCCTCTGAAAGAGCAGCCCGCTCTGAACGACA
GCAGATACTGCCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCC
ACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGATGCCA
GGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGA
CCCAGGATAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCT
GCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAG
CGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGTCTGCCACAATCCT
GTACGAGATCCTGCTGGGAAAAGCCACTCTGTACGCTGT
GCTGGTGTCCGCTCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCG
GAAGGATAGCAGGGGGCGGCTCCGGTGCCACAACTTCT
CCCTGCTCAAGCAGGCCGGAGATGTGGAAGAGAACCCT
GGCCCTATGATCAGCCTGAGAGTGCTGCTGGTCATCCTG
TGGCTGCAGCTGTCTTGGGTCTGGTCCCAGCGGAAAGAG
GTGGAACAGGACCCCGGACCTTTCAATGTGCCTGAAGG
CGCCACCGTGGCCTTCAACTGCACCTACAGCAATAGCGC
CAGCCAGAGCTTCTTCTGGTACAGACAGGACTGCCGGA
AAGAACCCAAGCTGCTGATGAGCGTGTACAGCAGCGGC
AACGAGGACGGCAGATTCACAGCCCAGCTGAACAGAGC
CAGCCAGTACATCAGCCTGCTGATCCGGGATAGCAAGC
TGAGCGATAGCGCCACCTACCTGTGCGTGGTCAACCTGC
TGTCTAATCAAGGCGGCAAGCTGATCTTCGGCCAGGGC
ACAGAGCTGAGCGTGAAGCCCAACATTCAGAACCCCGA
TCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGCAAGAGCAGCG
ACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAG
ACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACAT
CACCGATAAGACcGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTT
CAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCG
ATTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCC
CCGAGGACACATTCTTCCAAGTCCTGAGAGCAGCTGCG
ACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACC
AACCTGAACTTCCAGAACCTGTCCGTGATCGGCTTCCGG
ATCCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAACCTCCTGATG
ACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTAAcctCGACTGTGCCTTC

	<p>TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCT TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTCCT AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG CAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTG GGGATGCGGTGGGCTCTATGGcttctgagggcggaaagaaccagctggg gtctaggggtatccccACTAGTCGTGTACCAGCTGAGAGACTC TAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTT TGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGA TGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTC TATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCA ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACA GCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGgtaag ggcagcttfggtgccttcgcaggetgttcccttcttcaggaatggccaggttctgccagagc tctggtcaatgatgtctaaaactcctctgattggtggtctcggccttatccattgccacaaaacc ctcttttactaagaaacagtgagccttgttctggcagtccagagaatgacacgggaaaaaag cagatgaagagaaggtggcaggagagggcacgtggcccagcctcagtctctAGATCT AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA</p>
--	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, характеризующееся структурой формулы I:



или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амина и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил,

при условии, что применяется хотя бы одно из следующих условий:

(a) x_1 представляет собой C-R₃;

(b) R₁ представляет собой C₂-C₃ алкил;

(c) R₄ представляет собой C₁-C₃ алкил;

(d) R₂ замещен одним R₆, и R₆ представляет собой галоген;

(e) R₂ замещен двумя R₆, которые взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

(f) R₂ представляет собой C₃-C₅ циклоалкил, необязательно замещенный одним или более R₆.

2. Соединение по п. 1, где x_1 представляет собой C-R₃.

3. Соединение по п. 2, где R₃ представляет собой H или метил.

4. Соединение по п. 1, где x_1 представляет собой N.

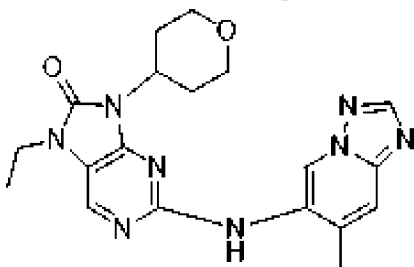
5. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R₁ представляет собой C₂-C₃ алкил.

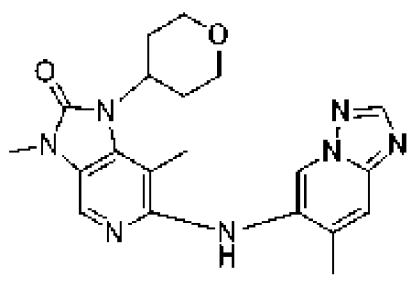
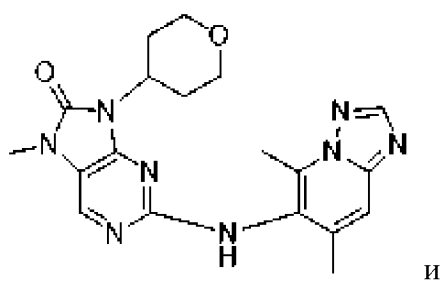
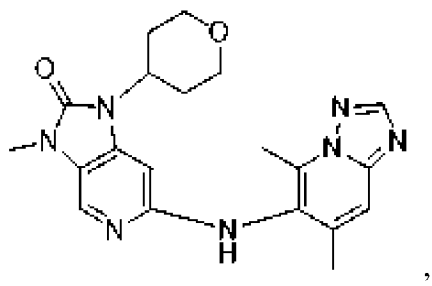
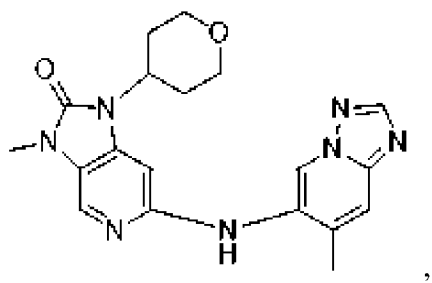
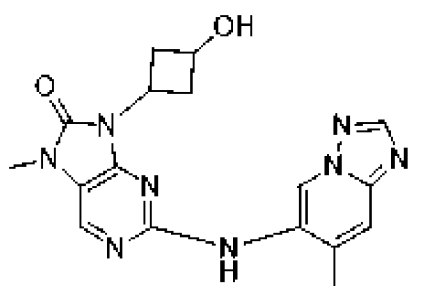
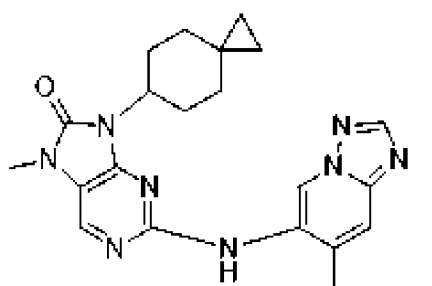
6. Соединение по любому из пп. 1-4, где R₁ выбран из метила и этила.

7. Соединение по п. 6, где R₁ представляет собой метил.

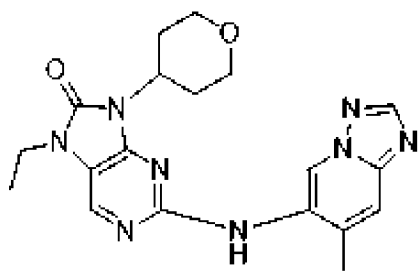
8. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R₄ представляет собой C₁-C₃ алкил.

9. Соединение по любому из пп. 1-7, где R_4 представляет собой H или метил.
10. Соединение по п. 9, где R_4 представляет собой H.
11. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R_2 представляет собой циклоалкил.
12. Соединение по п. 11, где R_2 представляет собой C_3 - C_7 циклоалкил.
13. Соединение по п. 12, где R_2 представляет собой циклогексил.
14. Соединение по любому из пп. 1-12, где R_2 представляет собой C_3 - C_5 циклоалкил.
15. Соединение по любому из пп. 1-10, где R_2 представляет собой гетероциклил.
16. Соединение по п. 15, где R_2 представляет собой 5-7-членный гетероциклил.
17. Соединение по п. 16, где R_2 представляет собой тетрагидропиранил.
18. Соединение по п. 16, где R_2 представляет собой тетрагидрофуранил.
19. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R_2 необязательно замещен одним или более R_6 , независимо выбранными из гидроксигруппы, галогена и циклоалкила, или два R_6 , взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо.
20. Соединение по п. 19, где R_2 замещен одним или более R_6 ; и каждый R_6 представляет собой галоген или гидроксил.
21. Соединение по п. 20, где R_2 замещен одним R_6 , и R_6 представляет собой галоген.
22. Соединение по п. 20 или п. 21, где каждый R_6 представляет собой фтор.
23. Соединение по п. 19, где R_2 замещен двумя R_6 , которые взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо.
24. Соединение по любому из пп. 1-18, где R_2 необязательно замещен одним или более R_6 , независимо выбранными из гидроксигруппы, метокси и метила.
25. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R_5 представляет собой метил.
26. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R_7 представляет собой H или метил.
27. Соединение, выбранное из:



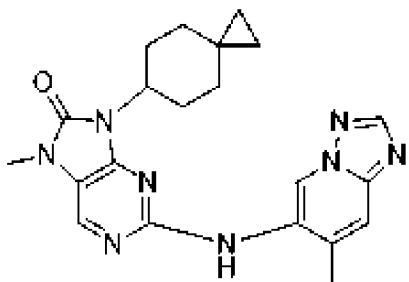


28. Соединение по п. 27, где соединение представляет собой



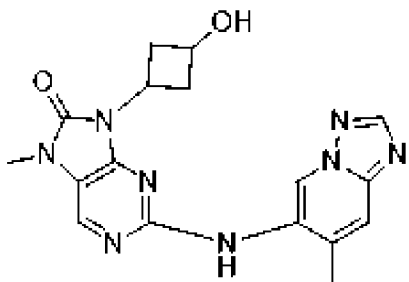
, или его соль.

29. Соединение по п. 27, где соединение представляет собой



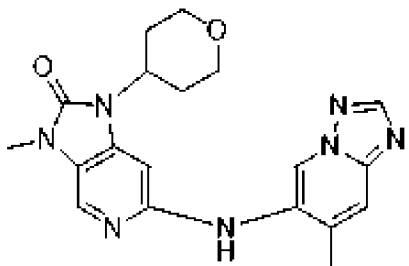
, или его соль.

30. Соединение по п. 27, где соединение представляет собой



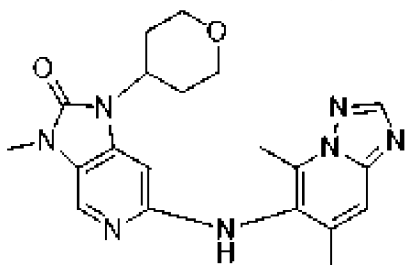
, или его соль.

31. Соединение по п. 27, где соединение представляет собой



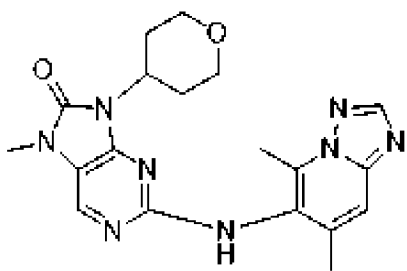
, или его соль.

32. Соединение по п. 27, где соединение представляет собой



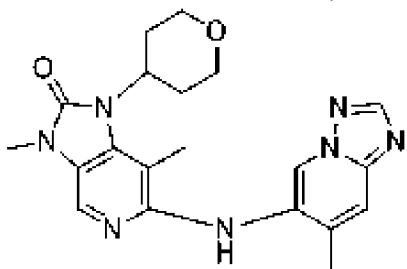
, или его соль.

33. Соединение по п. 27, где соединение представляет собой



, или его соль.

34. Соединение по п. 27, где соединение представляет собой



, или его соль.

35. Соединение по любому из пп. 1-34, где соединение представляет собой свободное основание.

36. Соединение по любому из пп. 1-34, где соединение представляет собой соль.

37. Соединение по п. 36, где соль содержит трифлатный анион.

38. Композиция, содержащая

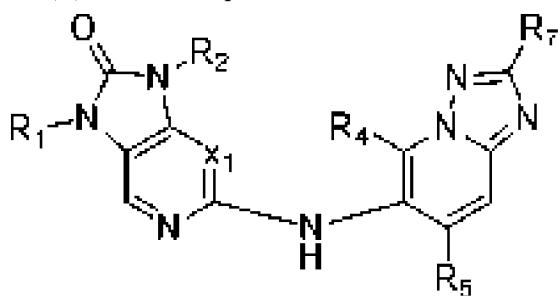
a) ингибитор ДНК протеинкиназы (ДНК-ПКИ);

b) агент для разрезания ДНК;

c) необязательно клетку; и

d) необязательно донорскую ДНК;

где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C- R_3 или N;

R_1 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

R_2 представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R_6 ;

R_3 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

R_4 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

R_5 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

каждый R_6 независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси,

циклоалкила, amino и циано, или два R_6 , взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R_7 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил.

39. Композиция по п. 38, где x_1 представляет собой N.

40. Композиция по п. 38 или п. 39, где R_1 представляет собой метил.

41. Композиция по любому из пп. 38-40, где R_4 представляет собой H.

42. Композиция по любому из пп. 38-41, где R_2 представляет собой циклогексил.

43. Композиция по любому из пп. 38-41, где R_2 представляет собой тетрагидропиранил.

44. Композиция по любому из пп. 38-41, где R_2 представляет собой тетрагидрофуранил.

45. Композиция по любому из пп. 38-44, где R_2 необязательно замещен одним или более R_6 , независимо выбранными из гидрокси, метокси и метила.

46. Композиция по любому из пп. 38-45, где R_5 представляет собой метил.

47. Композиция по любому из пп. 38-46, где R_7 представляет собой H или метил.

48. Композиция по п. 38, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение по любому из пп. 1-37.

49. Композиция, содержащая

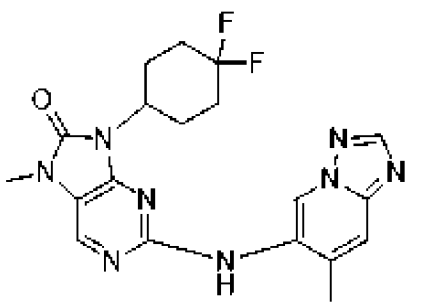
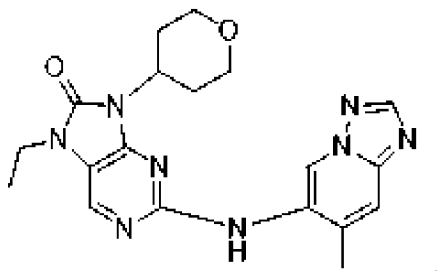
a) ингибитор ДНК протеинкиназы (ДНК-ПКИ);

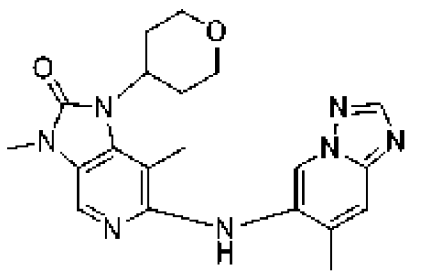
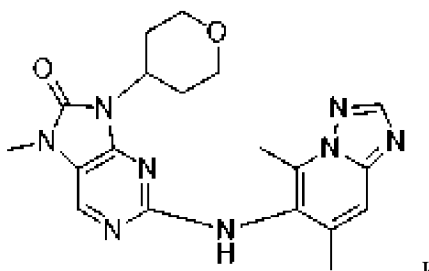
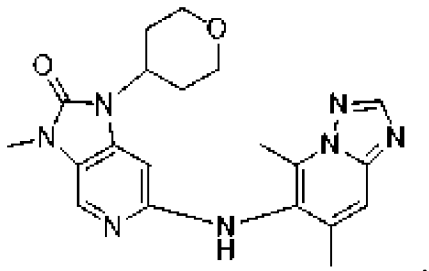
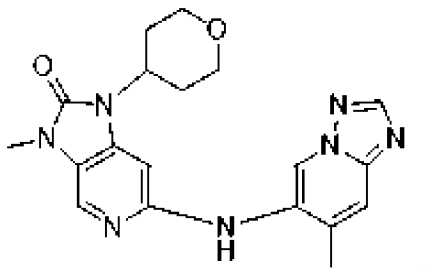
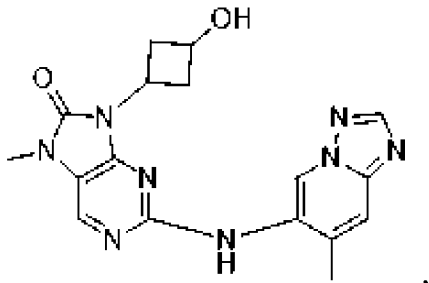
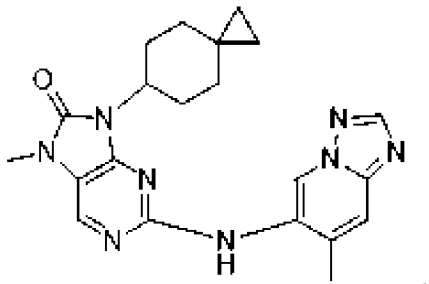
b) агент для разрезания ДНК;

c) необязательно клетку; и

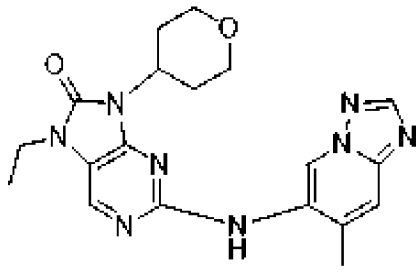
d) необязательно донорскую ДНК;

где ДНК-ПКИ выбран из:



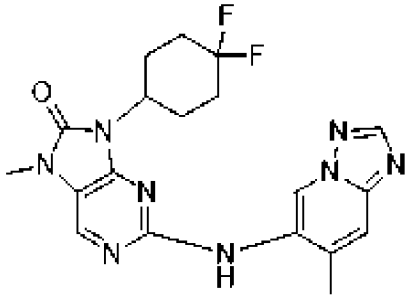


50. Композиция по п. 49, где ДНК-ПКИ представляет собой



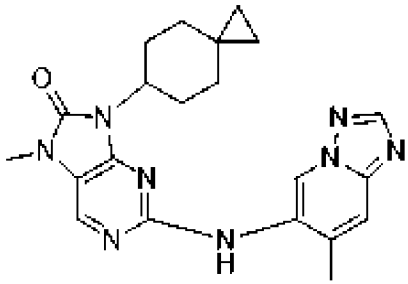
, или его соль.

51. Композиция по п. 49, где ДНК-ПКИ представляет собой



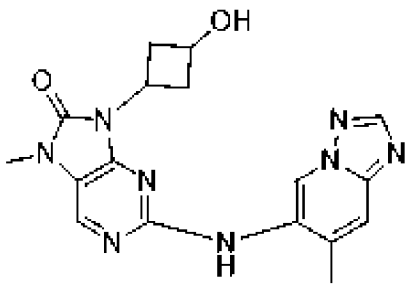
, или его соль.

52. Композиция по п. 49, где ДНК-ПКИ представляет собой



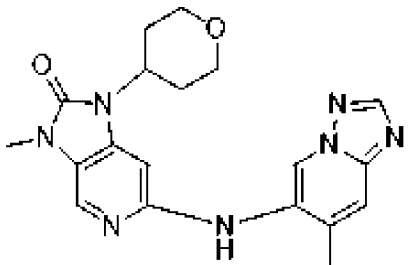
, или его соль.

53. Композиция по п. 49, где ДНК-ПКИ представляет собой



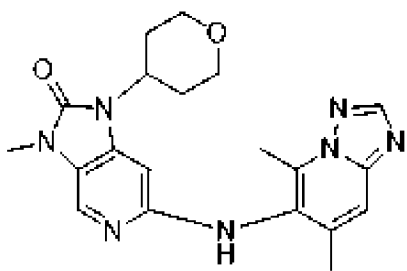
, или его соль.

54. Композиция по п. 49, где ДНК-ПКИ представляет собой



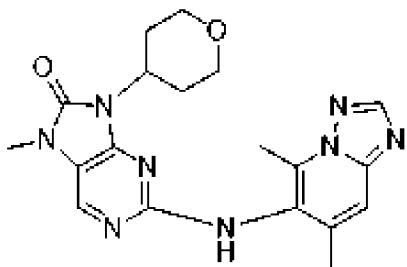
, или его соль.

55. Композиция по п. 49, где ДНК-ПКИ представляет собой



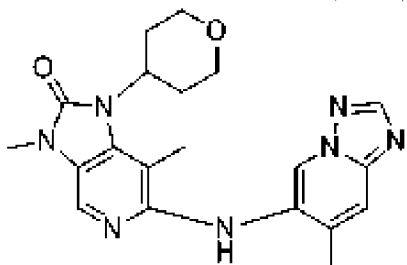
, или его соль.

56. Композиция по п. 49, где ДНК-ПКИ представляет собой



, или его соль.

57. Композиция по п. 49, где ДНК-ПКИ представляет собой



, или его соль.

58. Композиция по любому из пп. 38-57, где концентрация ДНК-ПКИ в композиции составляет около 1 мкМ или меньше.

59. Композиция по п. 58, где концентрация ДНК-ПКИ в композиции составляет около 0,25 мкМ или меньше.

60. Композиция по любому из пп. 38-57, где концентрация ДНК-ПКИ в композиции составляет около 0,1-1 мкМ.

61. Композиция по п. 60, где концентрация ДНК-ПКИ в композиции составляет около 0,1-0,5 мкМ.

62. Композиция по любому из пп. 38-61, содержащая клетку.

63. Композиция по п. 62, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

64. Композиция по п. 62, где клетка представляет собой клетку печени.

65. Композиция по п. 62, где клетка применима в адоптивной клеточной терапии (АСТ).

66. Композиция по п. 65, где клетка применима в адоптивной клеточной терапии.

67. Композиция по п. 65 или п. 66, где клетка представляет собой стволовую клетку.

68. Композиция по п. 67, где стволовая клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (HSC) или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC).

69. Композиция по любому из пп. 65-68, где клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку.

70. Композиция по п. 69, где иммунокомпетентная клетка представляет собой лейкоцит или лимфоцит.

71. Композиция по п. 70, где иммунокомпетентная клетка представляет собой лимфоцит.

72. Композиция по п. 71, где лимфоцит представляет собой Т-клетку, В-клетку или НК-клетку.

73. Композиция по п. 71, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.

74. Композиция по п. 73, где Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку.

75. Композиция по п. 73, где Т-клетка представляет собой регуляторную Т-клетку.

76. Композиция по любому из пп. 73-75, где лимфоцит представляет собой активированную Т-клетку.

77. Композиция по любому из пп. 73-75, где лимфоцит представляет собой неактивированную Т-клетку.

78. Композиция по любому из пп. 62-77, где клетка представляет собой клетку человека.

79. Композиция по любому из пп. 38-78, где агент для разрезания ДНК содержит компонент нуклеазы CRISPR/Cas и необязательно компонент гидовой РНК.

80. Композиция по п. 79, где агент для разрезания ДНК выбран из нуклеазы типа «цинковые пальцы», нуклеазы домена эффектора TALE (TALEN), компонента нуклеазы CRISPR/Cas и их комбинаций.

81. Композиция по п. 79, где агент для разрезания ДНК представляет собой компонент нуклеазы CRISPR/Cas и компонент гидовой РНК.

82. Композиция по п. 81, где компонент нуклеазы CRISPR/Cas содержит нуклеазу Cas или мРНК, кодирующую нуклеазу Cas.

83. Композиция по п. 82, где компонент нуклеазы CRISPR/Cas содержит мРНК, кодирующую нуклеазу Cas.

84. Композиция по п. 82 или п. 83, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas класса 2.

85. Композиция по п. 84, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9.

86. Композиция по п. 85, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

87. Композиция по п. 85, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 *N. meningitidis*.

88. Композиция по п. 85, где нуклеаза Cas представляет собой Nme2Cas9.

89. Композиция по п. 81 или п. 82, где нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas12a.

90. Композиция по любому из пп. 38-89, содержащая модифицированную РНК.

91. Композиция по любому из пп. 79-90, где компонент гидовой РНК представляет

собой нуклеиновую кислоту, представленную гидовой РНК, такую как гидовая РНК.

92. Композиция по п. 91, где нуклеиновая кислота, представленная гидовой РНК, представляет собой гРНК.

93. Композиция по п. 91 или п. 92, где нуклеиновая кислота, представленная гидовой РНК, представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (дгРНК).

94. Композиция по п. 91 или п. 92, где нуклеиновая кислота, представленная гидовой РНК, представляет собой или кодирует одинарную гидовую (огРНК).

95. Композиция по любому из пп. 92-94, где гРНК представляет собой модифицированную гРНК.

96. Композиция по п. 95, где модифицированная гРНК содержит модификацию на одном или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце.

97. Композиция по п. 95 или п. 96, где модифицированная гРНК содержит модификацию в одном или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце.

98. Композиция по любому из пп. 38-97, где композиция содержит нуклеиновую кислоту, представленную гидовой РНК, и нуклеазу Cas мРНК класса 2; и соотношение мРНК и нуклеиновой кислоты, представленной гидовой РНК, составляет от около 2:1 до 1:4 по массе.

99. Композиция по любому из пп. 38-98, содержащая донорскую ДНК.

100. Композиция по п. 99, где донорская ДНК содержит матрицу, содержащую последовательность, кодирующую белок, регуляторную последовательность или последовательность, кодирующую структурную РНК.

101. Композиция по любому из пп. 38-100, где агент для разрезания ДНК присутствует в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота.

102. Композиция по п. 101, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота представляет собой композицию липидных наночастиц (LNP).

103. Композиция по п. 102, где LNP характеризуется диаметром около 10-200 нм, около 20-150 нм, около 50-150 нм, около 50-100 нм, около 50-120 нм, около 60-100 нм, около 75-150 нм, около 75-120 нм или около 75-100 нм.

104. Композиция по п. 102 или п. 103, где композиция содержит популяцию LNP со средним диаметром около 10-200 нм, около 20-150 нм, около 50-150 нм, около 50-100 нм, около 50-120 нм, около 60-100 нм, около 75-150 нм, около 75-120 нм или около 75-100 нм.

105. Композиция по п. 104, где средний диаметр представляет собой Z-средний диаметр.

106. Композиция по п. 101, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота представляет собой липоплекс.

107. Композиция по любому из пп. 101-106, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит ионизируемый липид.

108. Композиция по п. 107, где ионизируемый липид характеризуется рКа от около 5,1 до 7,4, например, от около 5,5 до 6,6, от около 5,6 до 6,4, от около 5,8 до 6,2 или от около 5,8 до 6,5.

109. Композиция по любому из пп. 101-108, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит вспомогательный липид.

110. Композиция по любому из пп. 101-109, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит нейтральный липид.

111. Композиция по любому из пп. 101-110, где сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит PEG-липид

112. Композиция по любому из пп. 101-111, где соотношение N/P в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота составляет около 3-10.

113. Композиция по п. 112, где соотношение N/P в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота составляет около 5-7.

114. Композиция по п. 113, где соотношение N/P в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота составляет около 6.

115. Композиция по любому из пп. 38-114, дополнительно содержащая вектор.

116. Композиция по п. 115, где вектор кодирует агент для разрезания ДНК.

117. Композиция по п. 115 или п. 116, где вектор кодирует донорскую ДНК.

118. Композиция по любому из пп. 115-117, где вектор представляет собой вирусный вектор.

119. Композиция по любому из пп. 115-117, где вектор представляет собой невирусный вектор.

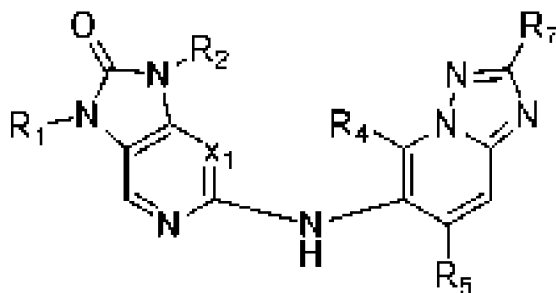
120. Композиция по п. 118, где вектор представляет собой лентивирусный вектор.

121. Композиция по п. 118, где вектор представляет собой ретровирусный вектор.

122. Композиция по п. 118, где вектор представляет собой AAV.

123. Композиция по п. 62, где клетка не представляет собой раковую клетку.

124. Способ направленного редактирования генома в клетке, предусматривающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



(Формула I)

или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

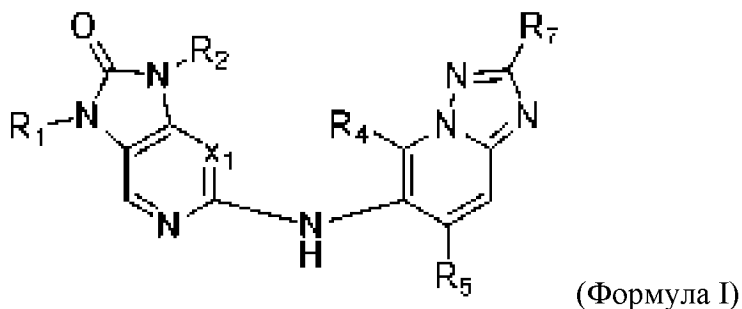
R_4 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

R_5 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

каждый R_6 независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амино и циано, или два R_6 , взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R_7 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил.

125. Способ восстановления двунитевого разрыва ДНК в геноме клетки, предусматривающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



или его соль,

где:

x_1 представляет собой C - R_3 или N;

R_1 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

R_2 представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R_6 ;

R_3 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

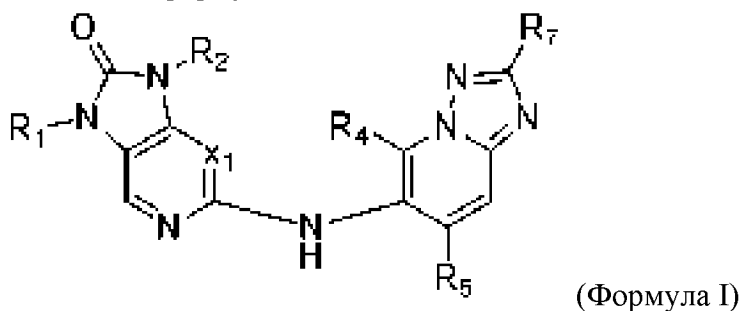
R_4 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил;

R_5 представляет собой C_1 - C_3 алкил;

каждый R_6 независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амино и циано, или два R_6 , взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R_7 представляет собой H или C_1 - C_3 алкил.

126. Способ ингибирования или подавления восстановления разрыва ДНК в клетке по пути негомологичного соединения концов (НГСК), предусматривающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

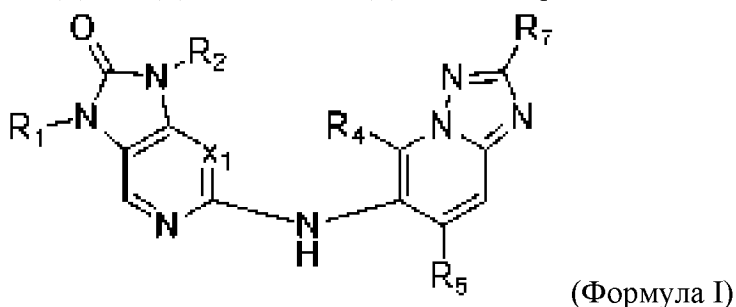
R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амина и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил.

127. Способ целенаправленной вставки донорской ДНК в геном клетки, предусматривающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК, донорской ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ представляет собой соединение формулы I



или его соль,

где:

x_1 представляет собой C-R₃ или N;

R₁ представляет собой C₁-C₃ алкил;

R₂ представляет собой циклоалкил или гетероциклил, и циклоалкил и гетероциклил необязательно замещены одним или более R₆;

R₃ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₄ представляет собой H или C₁-C₃ алкил;

R₅ представляет собой C₁-C₃ алкил;

каждый R₆ независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, алкила, алкокси, циклоалкила, амина и циано, или два R₆, взятые вместе с атомом или атомами, с которыми они связаны, образуют спироциклическое или конденсированное кольцо; и

R₇ представляет собой H или C₁-C₃ алкил.

128. Способ по любому из пп. 124-127, включающий выращивание клетки в клеточной среде, не содержащей ДНК-ПКИ, и добавление ДНК-ПКИ в клеточную среду.

129. Способ по любому из пп. 124-128, включающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК перед приведением в контакт клетки с ДНК-ПКИ.

130. Способ по п. 129, включающий приведение в контакт клетки с ДНК-ПКИ в течение около шести часов после приведения в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК.

131. Способ по п. 130, включающий приведение в контакт клетки с ДНК-ПКИ в течение около трех часов после приведения в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК.

132. Способ по любому из пп. 124-128, включающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК одновременно с ДНК-ПКИ.

133. Способ по любому из пп. 124-128, включающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК после приведения в контакт клетки с ДНК-ПКИ.

134. Способ по п. 133, включающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК в течение около трех часов после приведения в контакт клетки с ДНК-ПКИ.

135. Способ по п. 133 или п. 134, включающий выращивание клетки в клеточной среде, содержащей ДНК-ПКИ.

136. Способ по любому из пп. 124-135, в котором клетку приводят в контакт с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ в течение по меньшей мере около одного дня.

137. Способ по п. 136, в котором клетку приводят в контакт с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ в течение от около одного дня до одной недели.

138. Способ по п. 137, в котором клетку приводят в контакт с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ в течение около пяти дней.

139. Способ по любому из пп. 124-138, в котором x_1 представляет собой N.

140. Способ по любому из пп. 124-139, в котором R_1 представляет собой метил.

141. Способ по любому из пп. 124-140, в котором R_4 представляет собой H.

142. Способ по любому из пп. 124-141, в котором R_2 представляет собой циклогексил.

143. Способ по любому из пп. 124-141, в котором R_2 представляет собой тетрагидропиранил.

144. Способ по любому из пп. 124-141, в котором R_2 представляет собой тетрагидрофуранил.

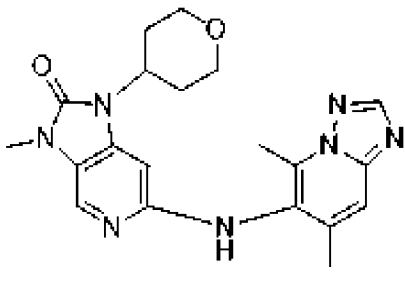
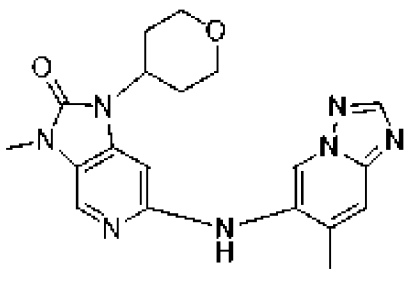
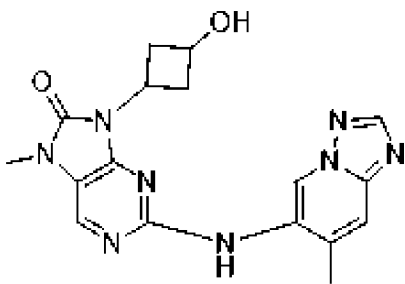
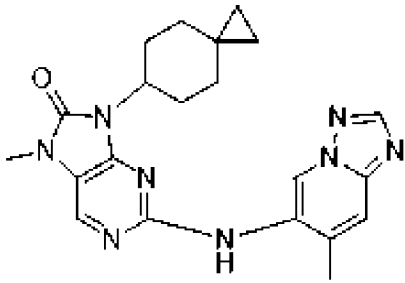
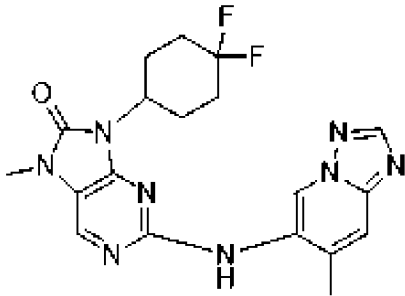
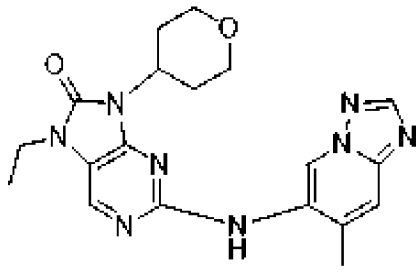
145. Способ по любому из пп. 124-144, в котором R_2 необязательно замещен одним или более R_6 , независимо выбранными из гидроксигруппы, метокси и метила.

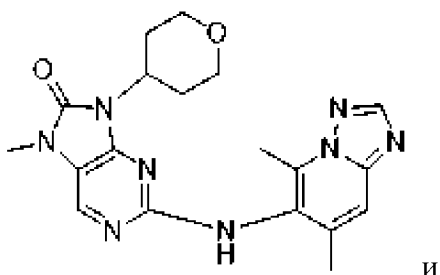
146. Способ по любому из пп. 124-145, в котором R_5 представляет собой метил.

147. Способ по любому из пп. 124-146, в котором R_7 представляет собой H или метил.

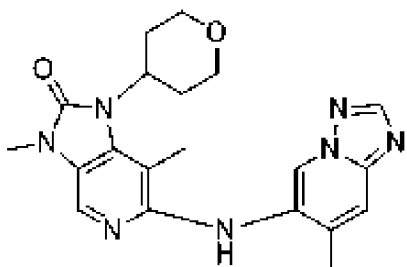
148. Способ по любому из пп. 124-147, в котором ДНК-ПКИ представляет собой соединение по любому из пп. 1-37.

149. Способ направленного редактирования генома в клетке, предусматривающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ выбран из:



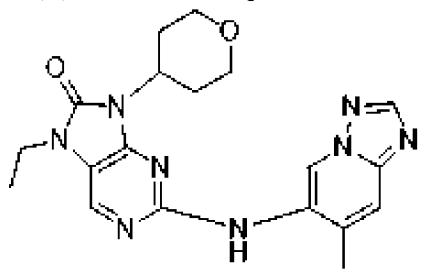


и

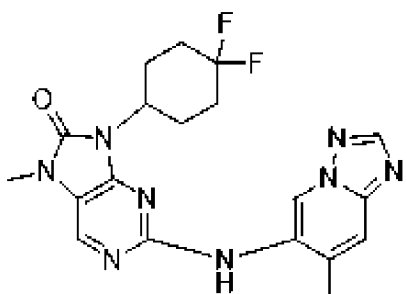


, или его соли.

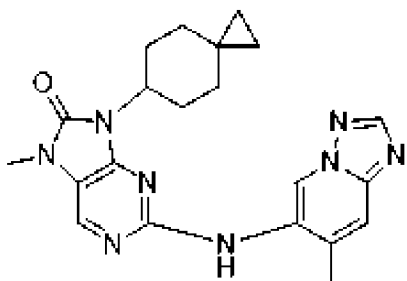
150. Способ восстановления двунитевого разрыва ДНК в геноме клетки, предусматривающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ выбран из:



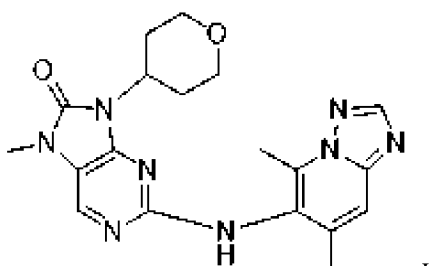
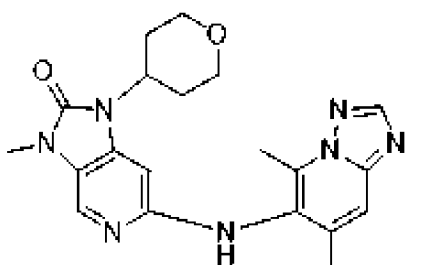
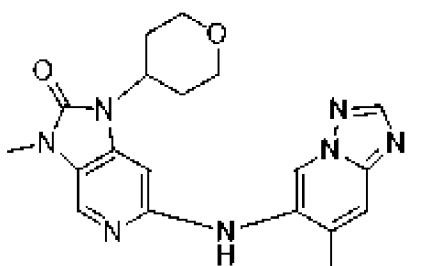
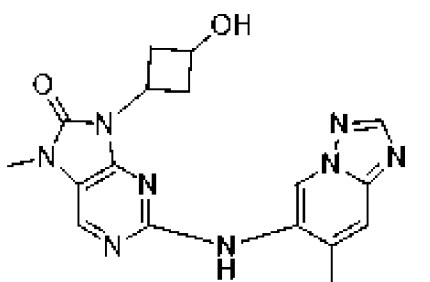
,



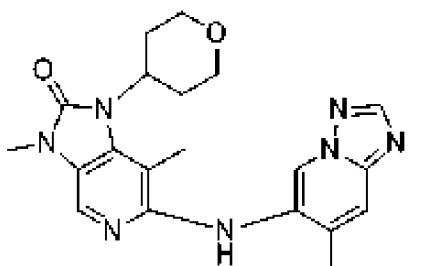
,



,

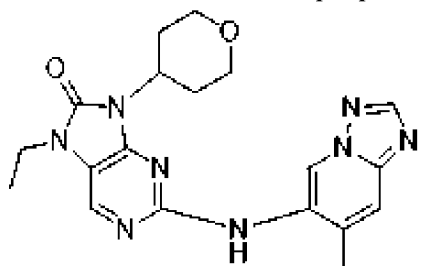


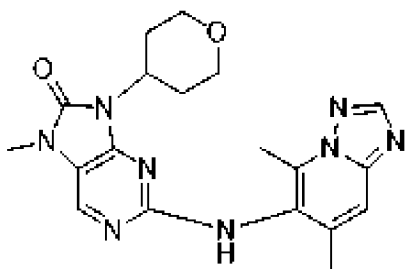
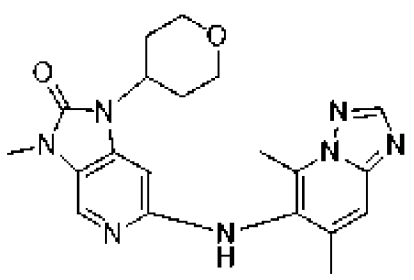
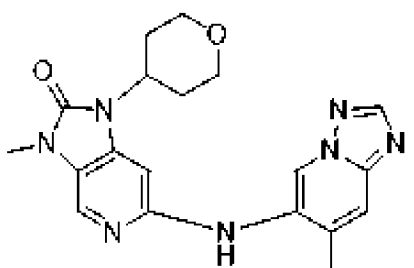
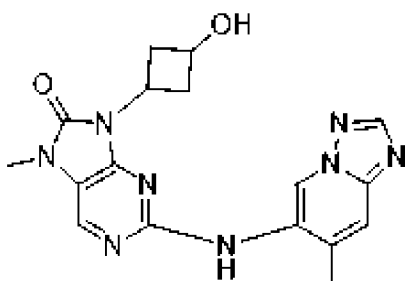
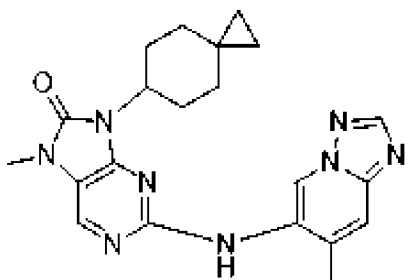
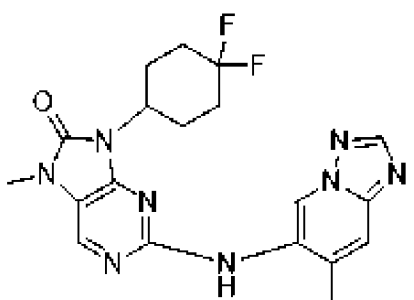
и



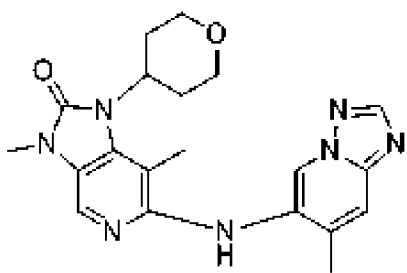
, или его соли.

151. Способ ингибирования или подавления восстановления разрыва ДНК в клетке путем негомологичного соединения концов (НГСК), предусматривающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ выбран из:



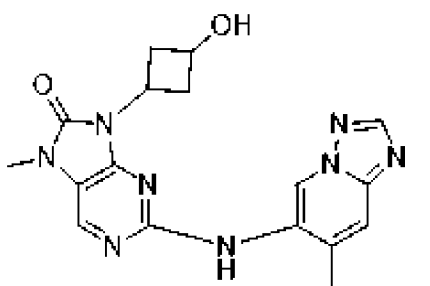
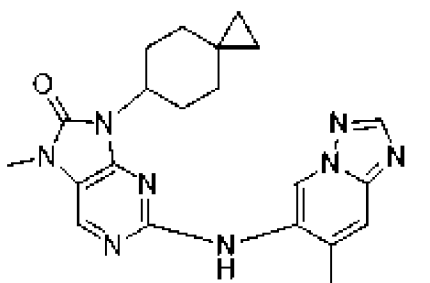
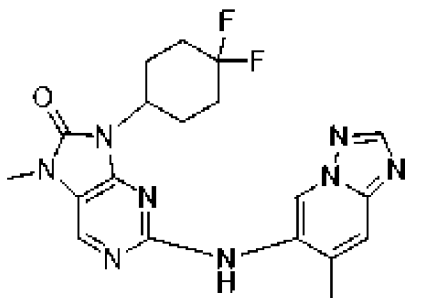
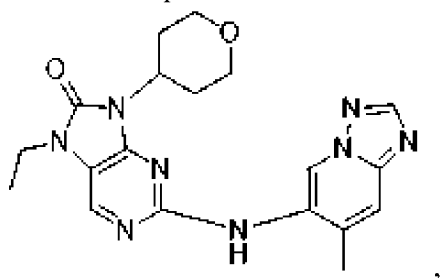


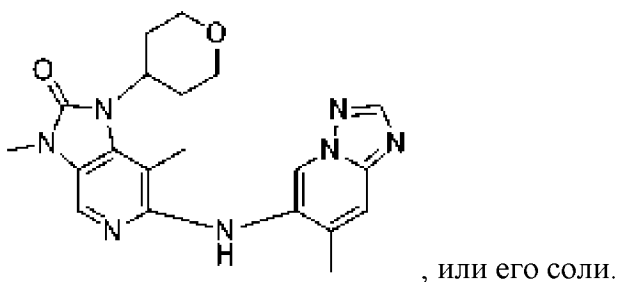
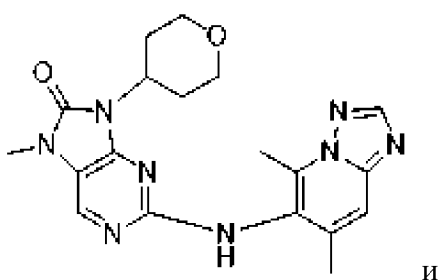
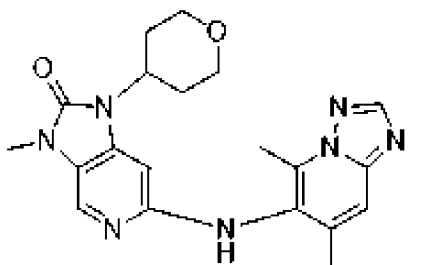
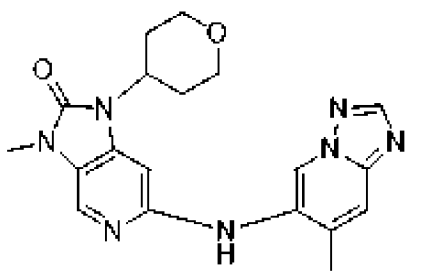
и



, или его соли.

152. Способ направленной вставки донорской ДНК в геном клетки, включающий приведение в контакт клетки с агентом для разрезания ДНК, донором ДНК и ДНК-ПКИ, где ДНК-ПКИ выбран из:

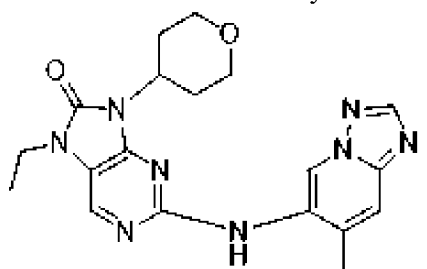




и

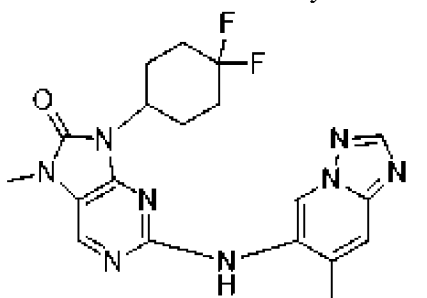
, или его соли.

153. Способ по любому из пп. 149-152, в котором ДНК-ПКИ представляет собой



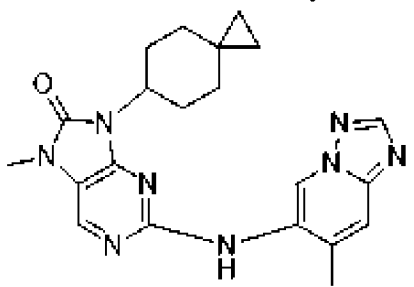
, или его соль.

154. Способ по любому из пп. 149-152, в котором ДНК-ПКИ представляет собой



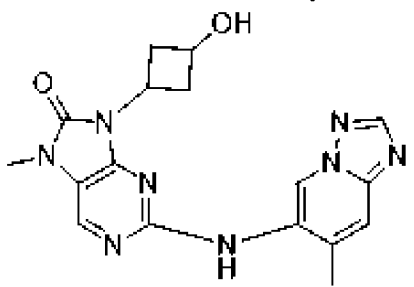
, или его соль.

155. Способ по любому из пп. 149-152, в котором ДНК-ПКИ представляет собой



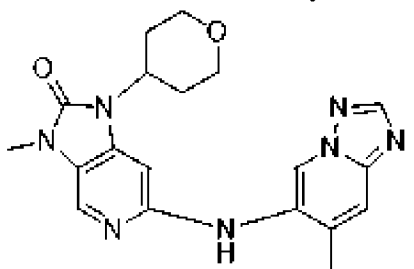
, или его соль.

156. Способ по любому из пп. 149-152, в котором ДНК-ПКИ представляет собой



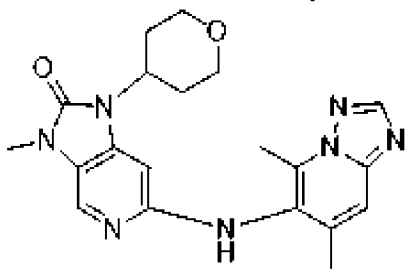
, или его соль.

157. Способ по любому из пп. 149-152, в котором ДНК-ПКИ представляет собой



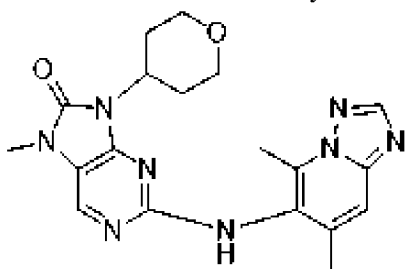
, или его соль.

158. Способ по любому из пп. 149-152, в котором ДНК-ПКИ представляет собой



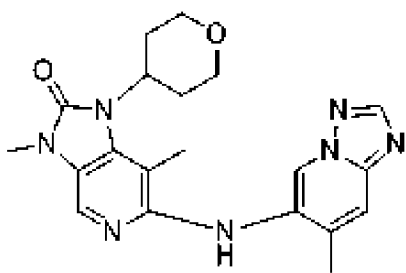
, или его соль.

159. Способ по любому из пп. 149-152, в котором ДНК-ПКИ представляет собой



, или его соль.

160. Способ по любому из пп. 149-152, в котором ДНК-ПКИ представляет собой



, или его соль.

161. Способ по любому из пп. 124-160, в котором клетку приводят в контакт с ДНК-ПКИ в клеточной среде, где концентрация ДНК-ПКИ в клеточной среде составляет около 1 мкМ или меньше.

162. Способ по п. 161, в котором концентрация ДНК-ПКИ в клеточной среде составляет около 0,25 мкМ или меньше.

163. Способ по любому из пп. 124-160, в котором клетку приводят в контакт с ДНК-ПКИ в клеточной среде, где концентрация ДНК-ПКИ в клеточной среде составляет около 0,1-1 мкМ.

164. Способ по п. 163, в котором концентрация ДНК-ПКИ в клеточной среде составляет около 0,1-0,5 мкМ.

165. Способ по любому из пп. 124-164, в котором клетка представляет собой эукариотическую клетку.

166. Способ по п. 165, в котором клетка представляет собой клетку печени.

167. Способ по любому из пп. 124-165, в котором клетка применима в адоптивной клеточной терапии (АСТ).

168. Способ по п. 167, в котором клетка применима в аутологической клеточной терапии.

169. Способ по любому из пп. 124-165, в котором клетка представляет собой стволовую клетку.

170. Способ по п. 169, в котором стволовая клетка представляет собой гематopoэтическую стволовую клетку (HSC).

171. Способ по п. 169, в котором клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC).

172. Способ по п. 168, в котором клетка представляет собой иммунокомпетентную клетку.

173. Способ по п. 172, в котором иммунокомпетентная клетка представляет собой лейкоцит или лимфоцит.

174. Способ по п. 173, в котором иммунокомпетентная клетка представляет собой лимфоцит.

175. Способ по п. 174, в котором лимфоцит представляет собой Т-клетку, В-клетку или NK-клетку.

176. Способ по п. 175, в котором лимфоцит представляет собой Т-клетку.

177. Способ по п. 176, в котором Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку.

178. Способ по п. 176, в котором Т-клетка представляет собой регуляторную Т-

клетку.

179. Способ по любому из пп. 174-178, в котором лимфоцит представляет собой активированную Т-клетку.

180. Способ по любому из пп. 174-178, в котором лимфоцит представляет собой неактивированную Т-клетку.

181. Способ по любому из пп. 124-180, в котором клетка представляет собой клетку человека.

182. Способ по любому из пп. 124-181, в котором агент для разрезания ДНК выбран из нуклеазы типа «цинковые пальцы», нуклеазы домена эффектора TALE (TALEN), компонента нуклеазы CRISPR/Cas и их комбинаций.

183. Способ по п. 182, в котором агент для разрезания ДНК представляет собой компонент нуклеазы CRISPR/Cas.

184. Способ по п. 183, в котором компонент нуклеазы CRISPR/Cas содержит нуклеазу Cas или мРНК, кодирующую нуклеазу Cas.

185. Способ по п. 184, в котором компонент нуклеазы CRISPR/Cas содержит мРНК, кодирующую нуклеазу Cas.

186. Способ по п. 184 или п. 185, в котором нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas класса 2.

187. Способ по п. 186, в котором нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9.

188. Способ по п. 187, в котором нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

189. Способ по п. 187, в котором нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 *N. meningitidis*.

190. Способ по п. 187, в котором нуклеаза Cas представляет собой Nme2Cas9.

191. Способ по п. 186, в котором нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas12a.

192. Способ по любому из пп. 124-191, дополнительно включающий приведение в контакт клетки с модифицированной РНК.

193. Способ по любому из пп. 124-192, дополнительно включающий приведение в контакт клетки с нуклеиновой кислотой с гидовой РНК.

194. Способ по п. 193, в котором нуклеиновая кислота с гидовой РНК представляет собой гРНК.

195. Способ по п. 193 или п. 194, в котором нуклеиновая кислота с гидовой РНК представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (дгРНК).

196. Способ по п. 193 или п. 194, в котором нуклеиновая кислота, представленная гидовой РНК, представляет собой или кодирует одинарную гидовую (огРНК).

197. Способ по любому из пп. 194-196, в котором гРНК представляет собой модифицированную гРНК.

198. Способ по п. 197, в котором модифицированная гРНК содержит модификацию на одном или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце.

199. Способ по п. 197 или п. 198, в котором модифицированная гРНК содержит

модификацию в одном или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце.

200. Способ по любому из пп. 193-199, в котором агент для разрезания ДНК представляет собой нуклеазу Cas мРНК класса 2; и соотношение мРНК и нуклеиновой кислоты, представленной гидовой РНК, составляет от около 2:1 до 1:4 по массе.

201. Способ по любому из пп. 124-200, дополнительно включающий приведение в контакт клетки с донорской ДНК.

202. Способ по п. 201, дополнительно предусматривающий приведение в контакт клетки с вектором, содержащим донорскую ДНК.

203. Способ по п. 201 или по п. 202, в котором донорская ДНК содержит матрицу, содержащую последовательность, кодирующую белок, регуляторную последовательность, последовательность, кодирующую структурную РНК.

204. Способ по п. 203, в котором последовательность матрицы интегрирована в геном клетки с помощью гомологически направленной репарации (HDR).

205. Способ по любому из пп. 124-205, предусматривающий приведение в контакт клетки со сборной композицией липид-нуклеиновая кислота, содержащей агент для разрезания ДНК.

206. Способ по п. 205, в котором сборная композиция липид-нуклеиновая кислота представляет собой композицию липидных наночастиц (LNP).

207. Способ по п. 206, в котором LNP характеризуется диаметром около 10-200 нм, около 20-150 нм, около 50-150 нм, около 50-100 нм, около 50-120 нм, около 60-100 нм, около 75-150 нм, около 75-120 нм или около 75-100 нм.

208. Способ по п. 206 или п. 207, включающий приведение в контакт клетки с популяцией LNP со средним диаметром около 10-200 нм, около 20-150 нм, около 50-150 нм, около 50-100 нм, около 50-120 нм, около 60-100 нм, около 75-150 нм, около 75-120 нм или около 75-100 нм.

209. Способ по п. 207 или п. 208, в котором средний диаметр представляет собой Z-средний диаметр.

210. Способ по любому из пп. 205-209, в котором сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит ионизируемый липид.

211. Способ по п. 210, в котором ионизируемый липид характеризуется рКа от около 5,1 до 7,4, например, от около 5,5 до 6,6, от около 5,6 до 6,4, от около 5,8 до 6,2 или от около 5,8 до 6,5.

212. Способ по любому из пп. 205-211, в котором сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит вспомогательный липид.

213. Способ по любому из пп. 205-212, в котором сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит нейтральный липид.

214. Способ по любому из пп. 205-213, в котором сборная композиция липид-нуклеиновая кислота содержит PEG-липид

215. Способ по любому из пп. 205-214, в котором соотношение N/P в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота составляет около 3-10.

216. Способ по п. 215, в котором соотношение N/P в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота составляет около 5-7.

217. Способ по п. 216, в котором соотношение N/P в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота составляет около 6.

218. Способ по любому из пп. 124-217, дополнительно включающий приведение в контакт клетки с вектором.

219. Способ по п. 218, в котором вектор кодирует агент для разрезания ДНК.

220. Способ по п. 218 или п. 219, в котором вектор кодирует донорскую ДНК.

221. Способ по любому из пп. 218-220, в котором вектор представляет собой вирусный вектор.

222. Способ по любому из пп. 218-220, в котором вектор представляет собой невирусный вектор.

223. Способ по п. 221, в котором вектор представляет собой лентивирусный вектор.

224. Способ по п. 221, в котором вектор представляет собой ретровирусный вектор.

225. Способ по п. 221, в котором вектор представляет собой AAV.

226. Способ по любому из пп. 124-225, в котором агент для разрезания ДНК взаимодействует с целевой последовательностью в геноме клетки, что приводит к двунитевому разрыву ДНК (DSB).

227. Способ по любому из пп. 124-226, в котором способ приводит к нокауту гена.

228. Способ по любому из пп. 124-227, в котором способ приводит к коррекции гена.

229. Способ по любому из пп. 124-227, в котором способ приводит к вставке генов.

230. Способ по любому из пп. 203-229, в котором донорская ДНК содержит матрицу, содержащую экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок.

231. Способ по п. 230, в котором белок выбран из цитокина, иммуносупрессора, антитела, рецептора и фермента.

232. Способ по п. 231, в котором белок представляет собой рецептор.

233. Способ по п. 231 или п. 232, в котором рецептор выбран из иммунологического рецептора, Т-клеточного рецептора (TCR) и химерного антигенного рецептора.

234. Способ по п. 233, в котором рецептор представляет собой иммунологический рецептор. 235. Способ по п. 233, в котором рецептор представляет собой TCR.

235. Способ по п. 230, в котором экзогенная нуклеиновая кислота кодирует α -цепь TCR и/или β -цепь TCR в TCR.

236. Способ по п. 233, в котором рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор.

237. Способ по любому из пп. 230-236, в котором агент для разрезания ДНК взаимодействует с целевой последовательностью в геноме клетки, что приводит к двунитевому разрыву ДНК (DSB).

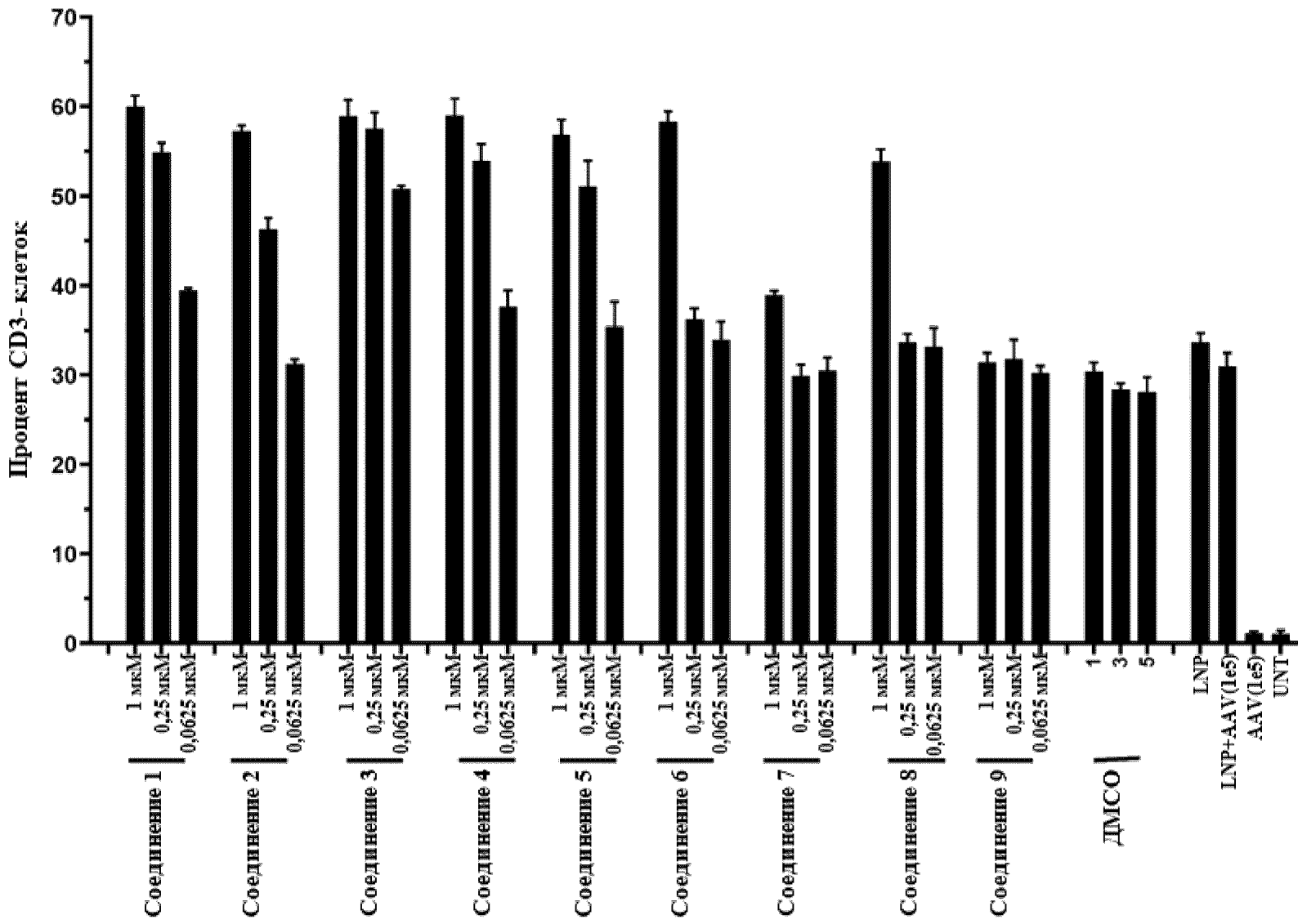
238. Способ по любому из пп. 230-237, в котором агент для разрезания ДНК

взаимодействует с целевой последовательностью в гене TRAC T-клетки.

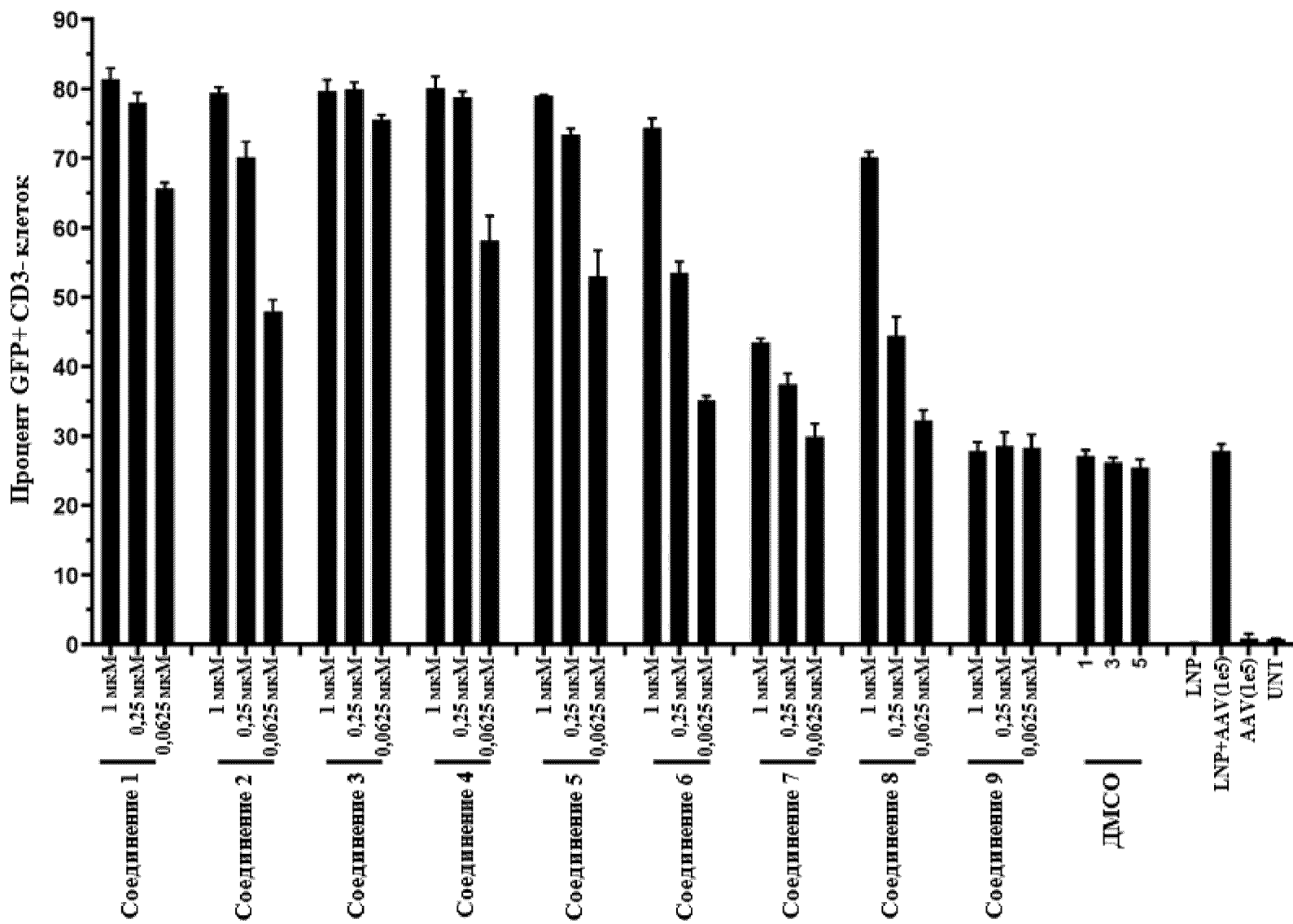
239. Способ по любому из пп. 230-238, в котором матрица интегрирована в ген TRAC T-клетки.

240. Способ по любому из пп. 230-239, в котором матрица содержит первое плечо гомологии и второе плечо гомологии, которые комплементарны последовательностям, расположенным выше или ниже сайта расщепления, соответственно.

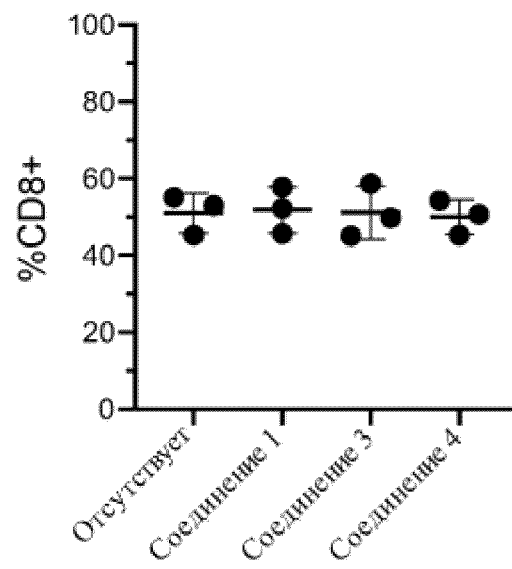
По доверенности



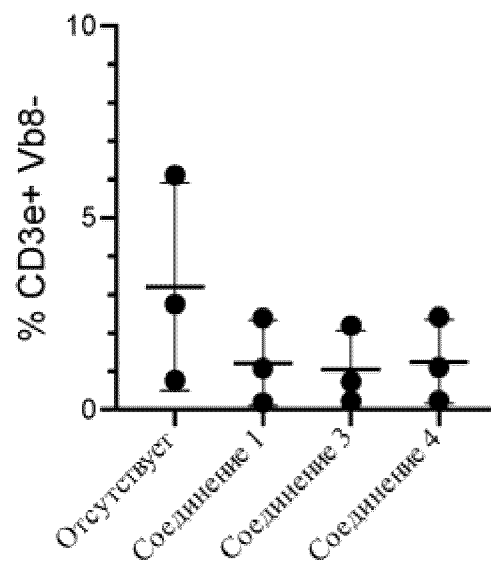
Фиг. 1А



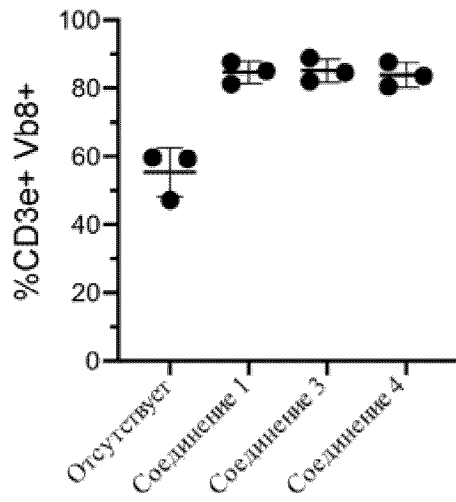
Фиг. 1В



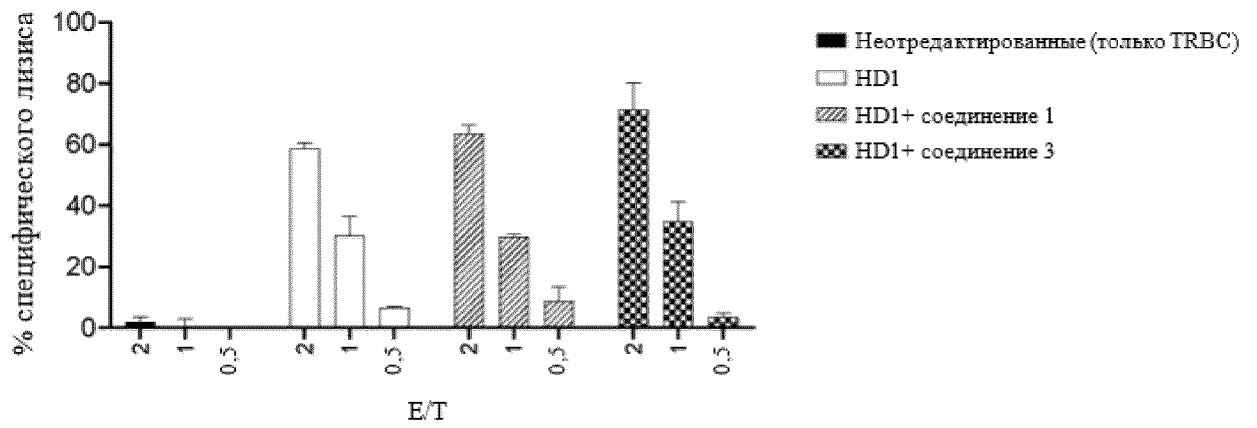
Фиг. 2А



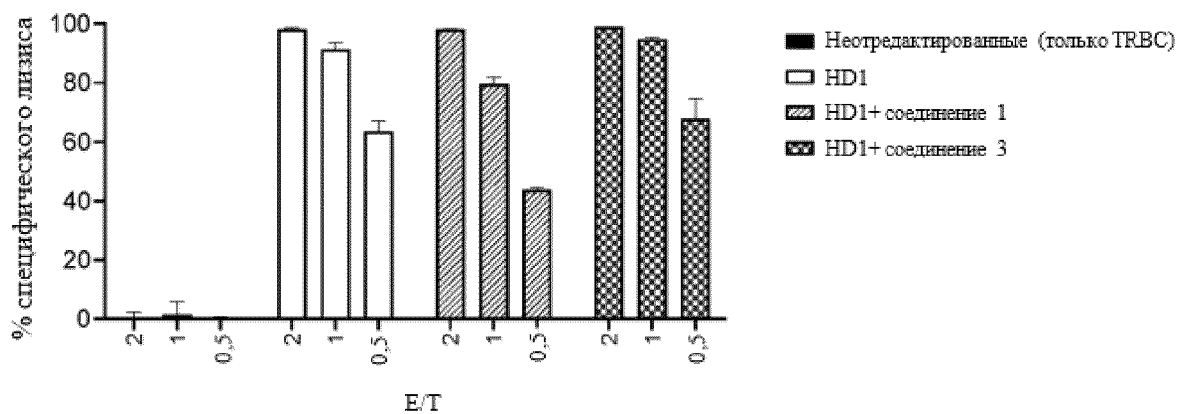
Фиг. 2В



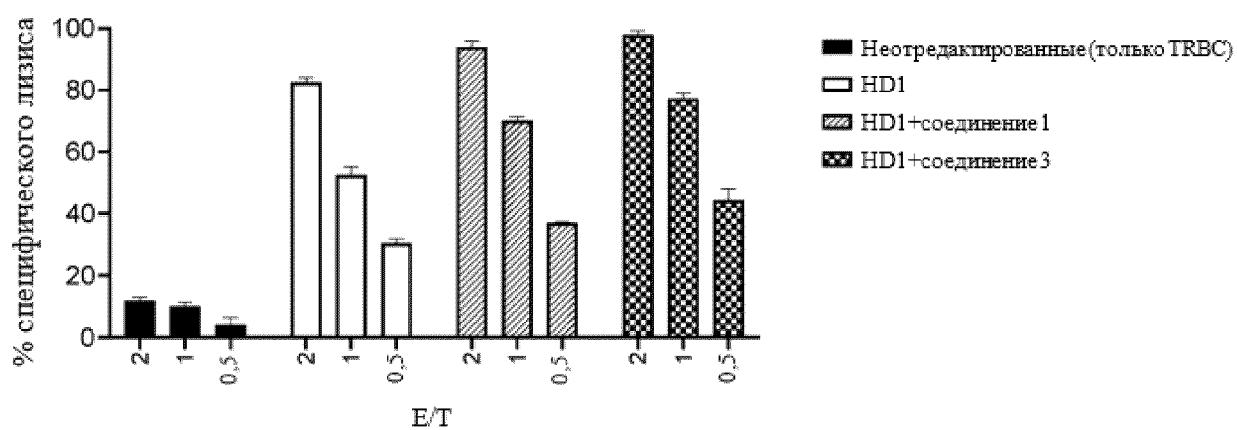
Фиг. 2С



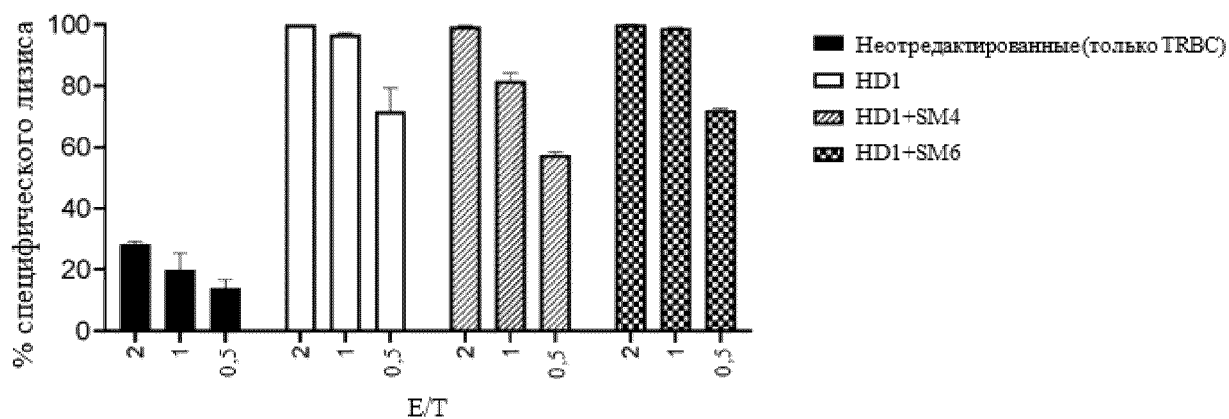
Фиг. 3А



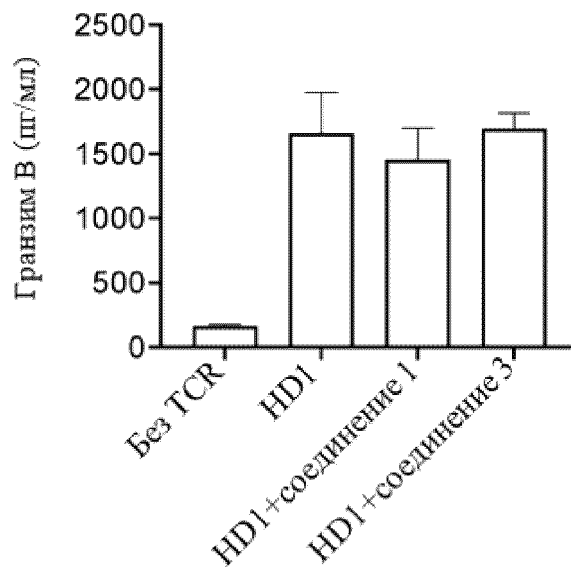
Фиг. 3В



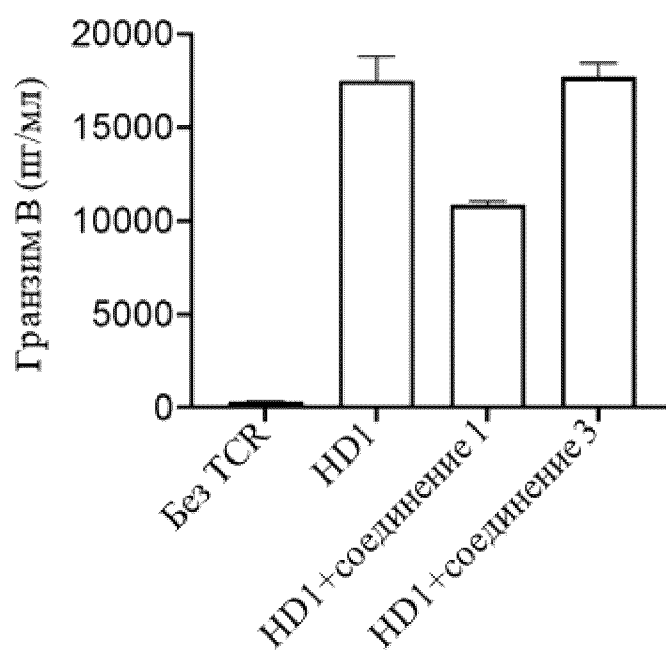
Фиг. 3С



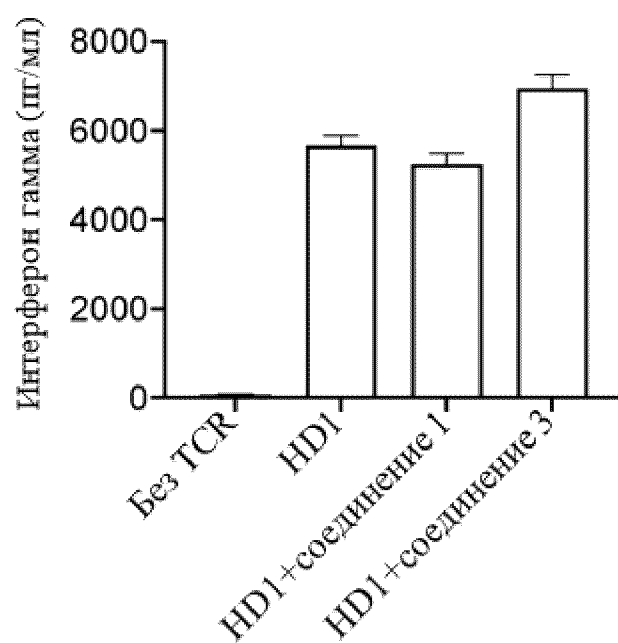
Фиг. 3D



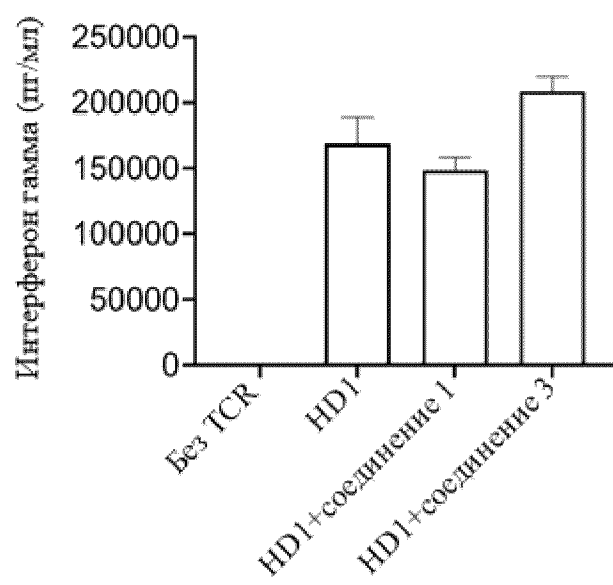
Фиг. 4А



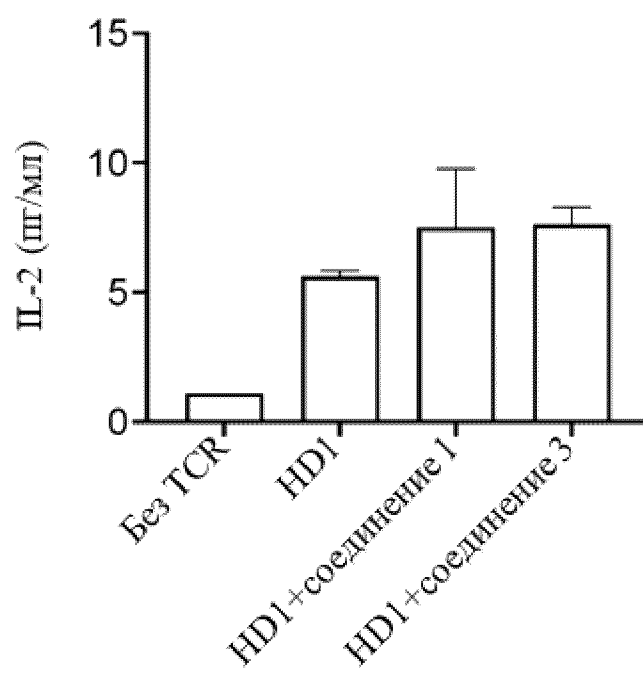
Фиг. 4В



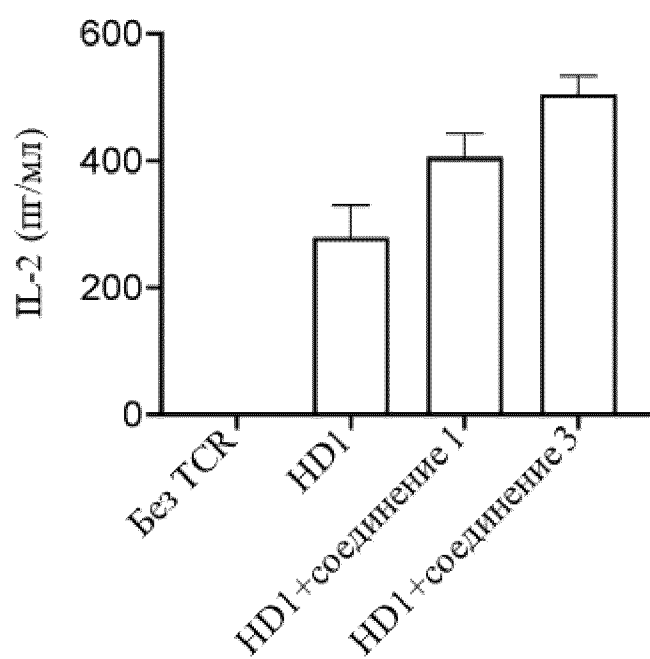
Фиг. 4С



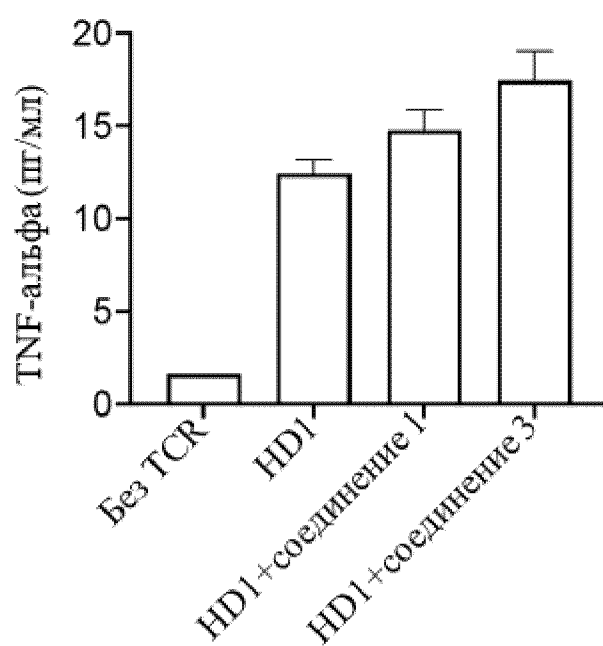
Фиг. 4D



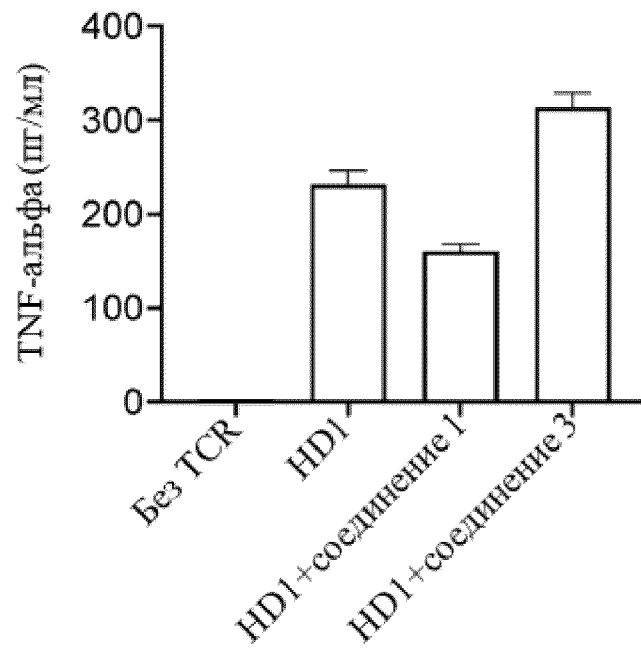
Фиг. 4E



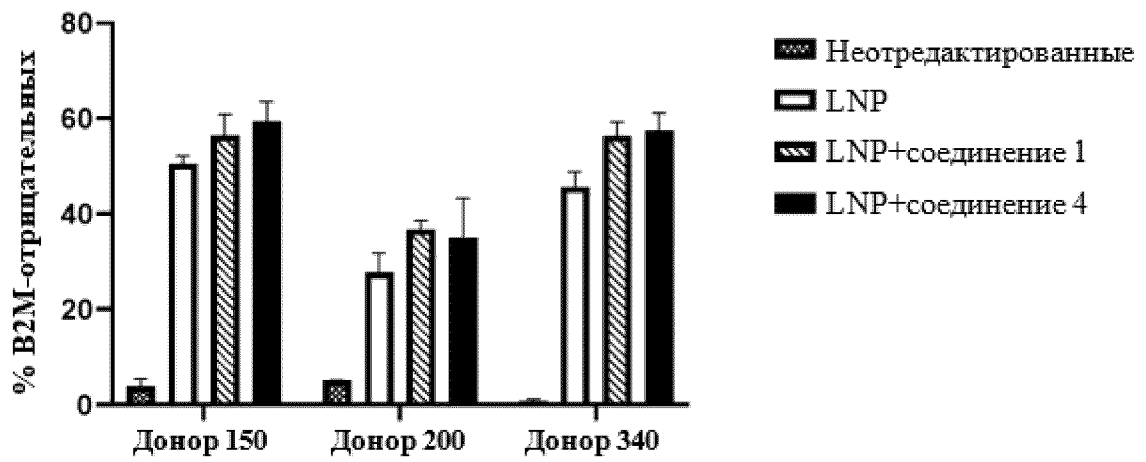
Фиг. 4F



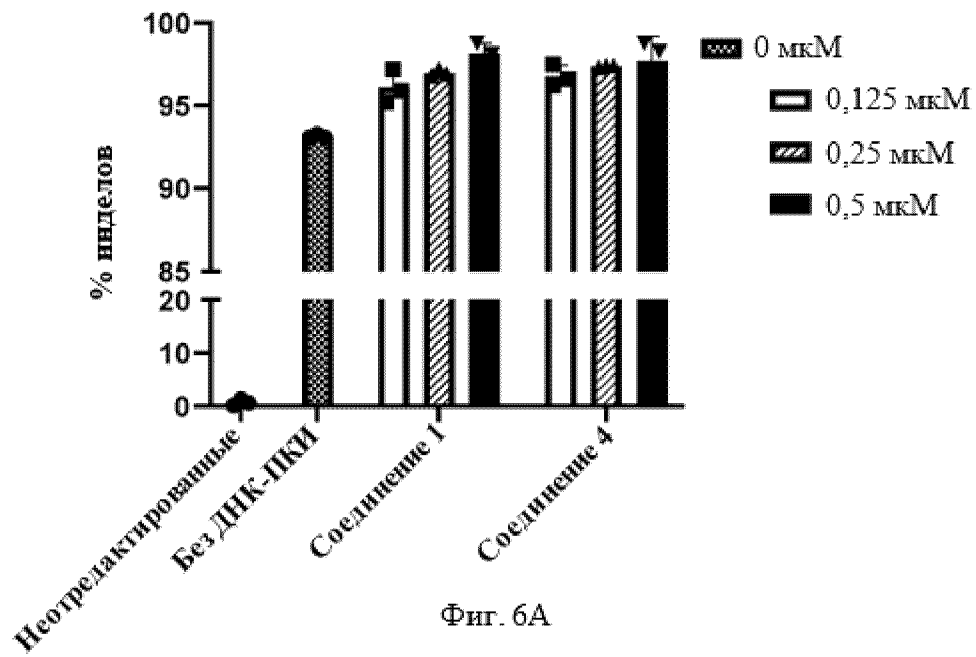
Фиг. 4G



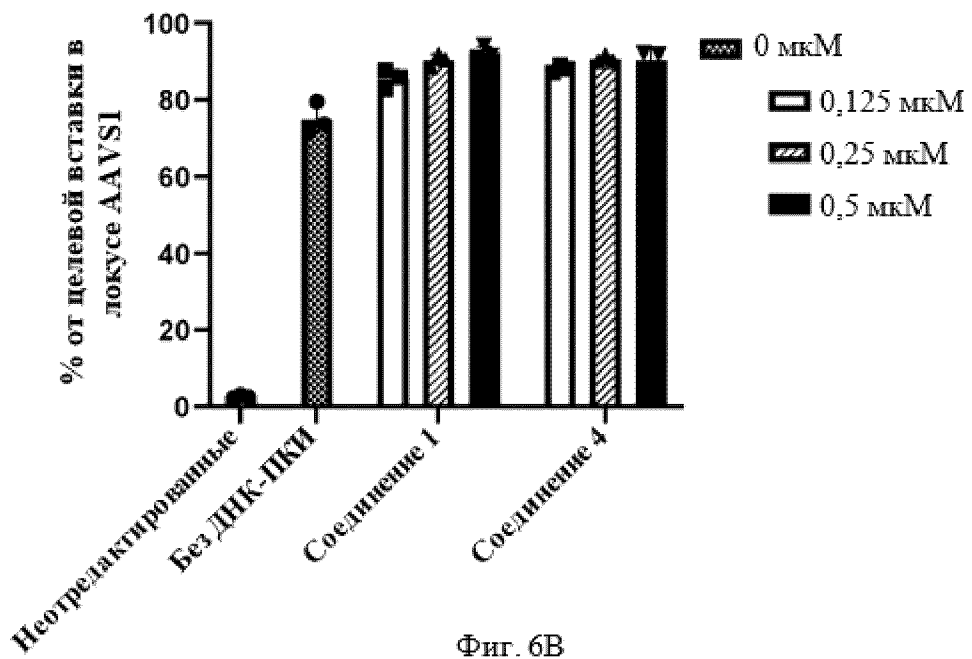
Фиг. 4Н



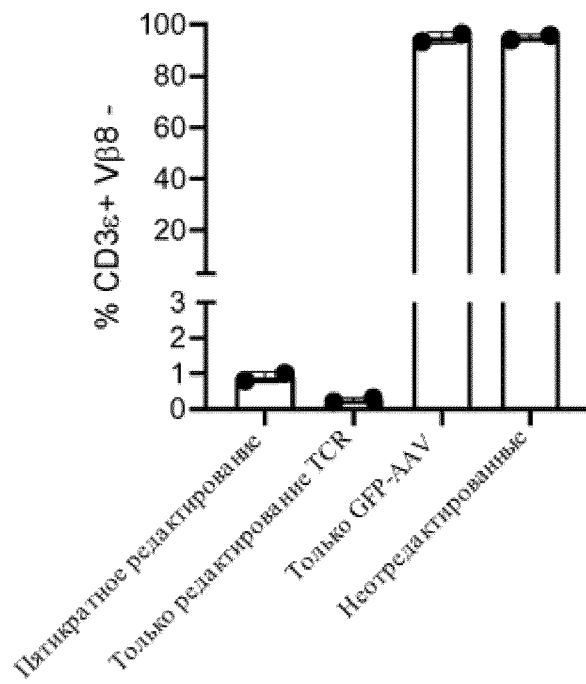
Фиг. 5



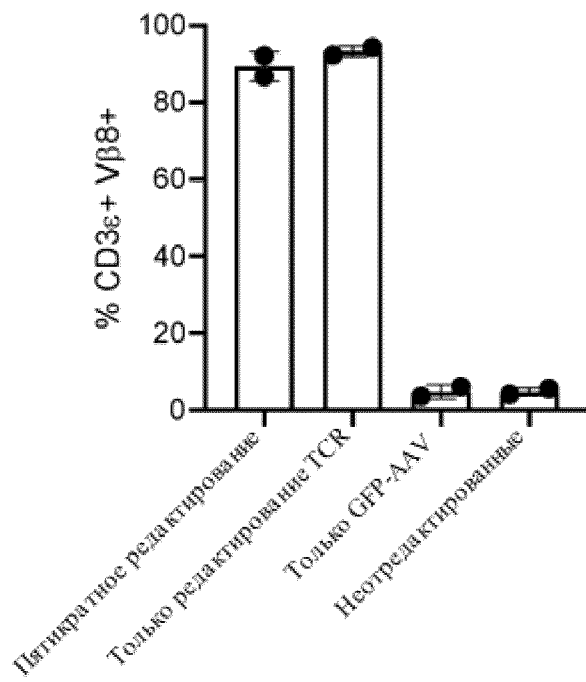
Фиг. 6А



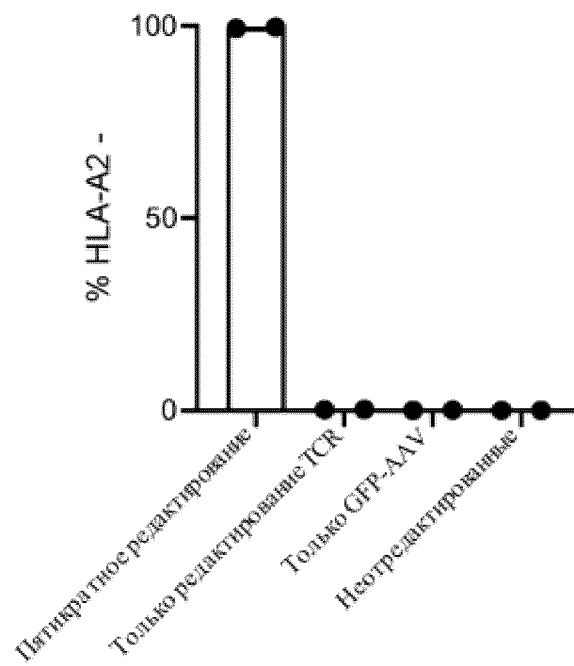
Фиг. 6В



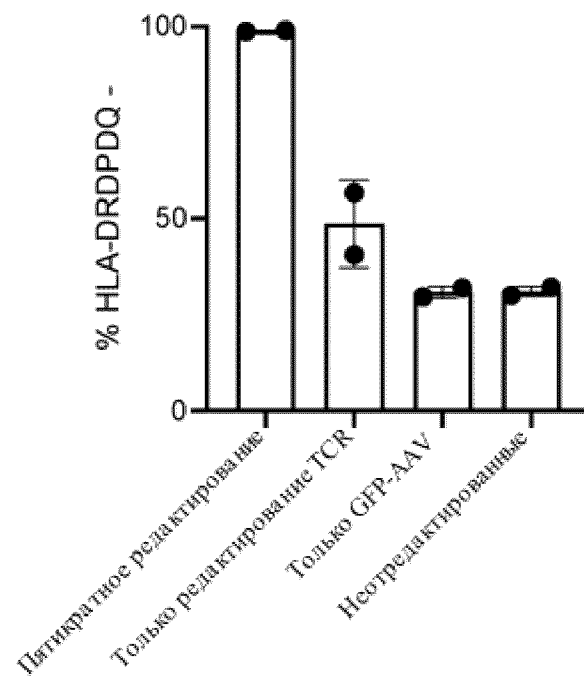
Фиг. 7А



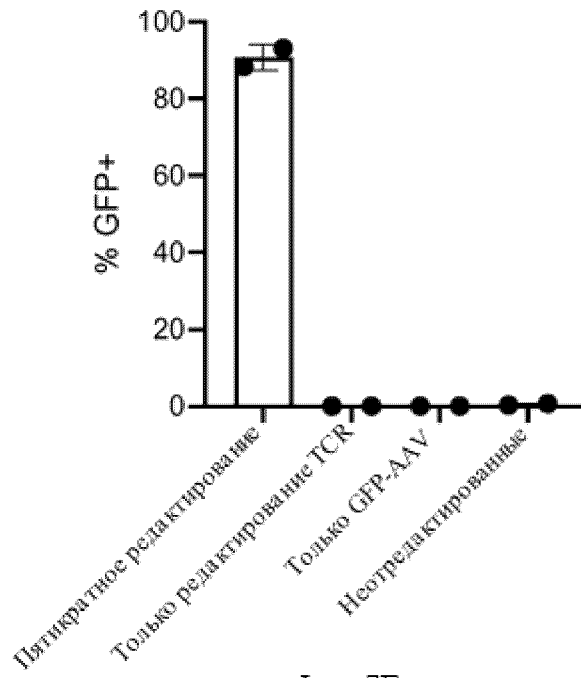
Фиг. 7В



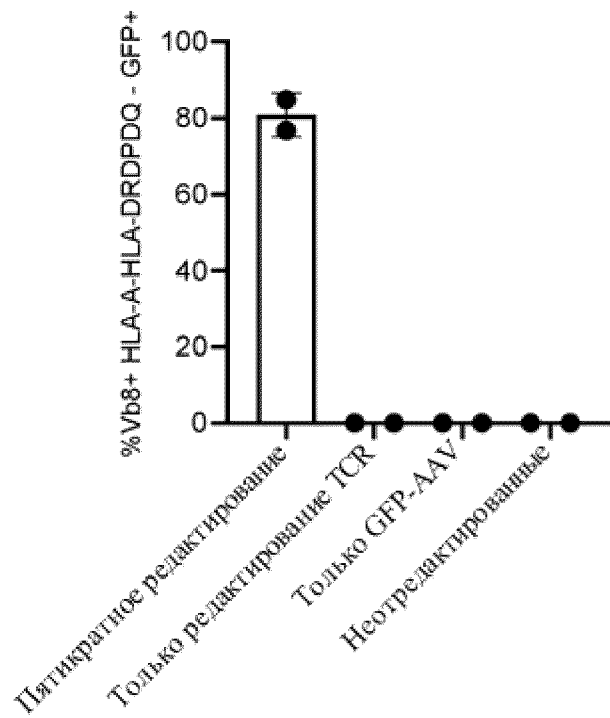
Фиг. 7C



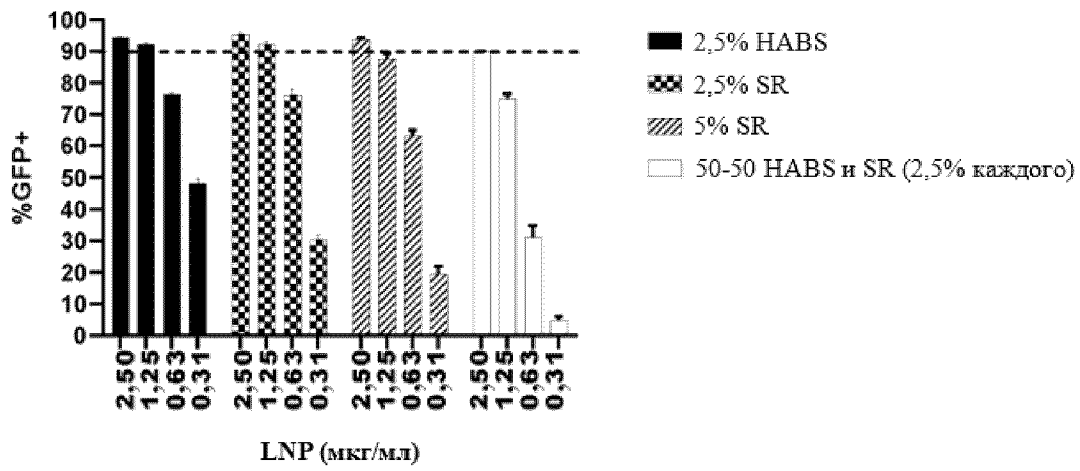
Фиг. 7D



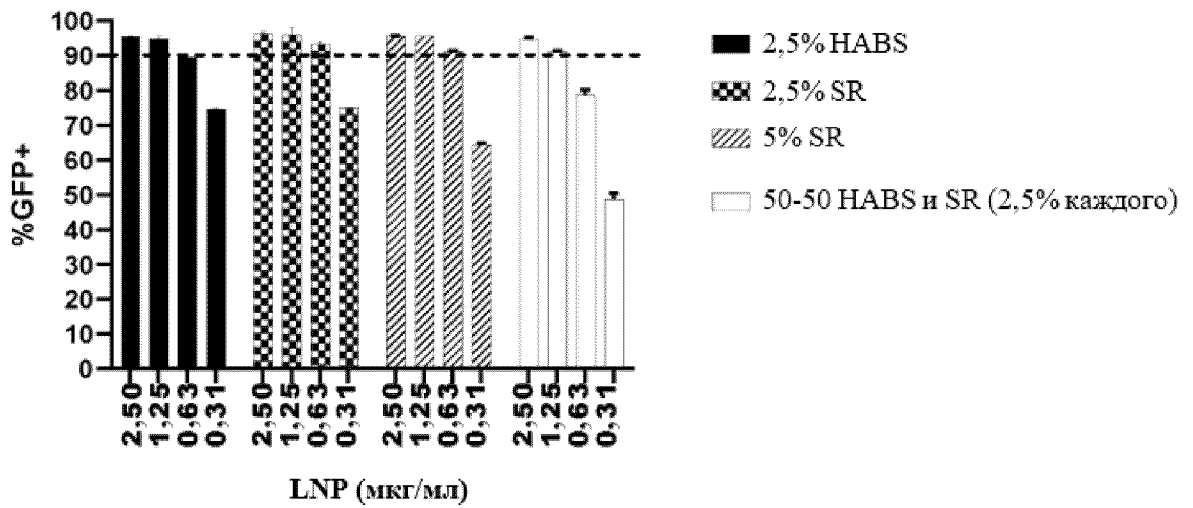
Фиг. 7E



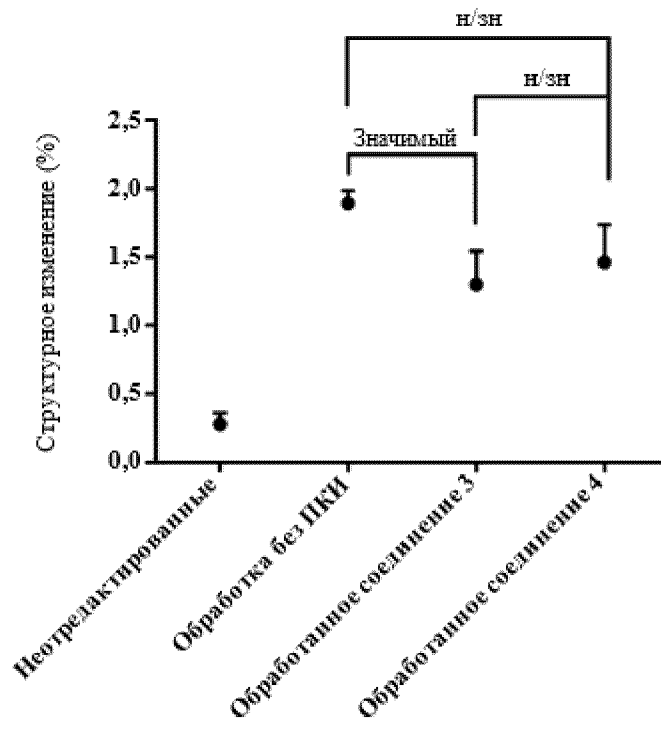
Фиг. 7F



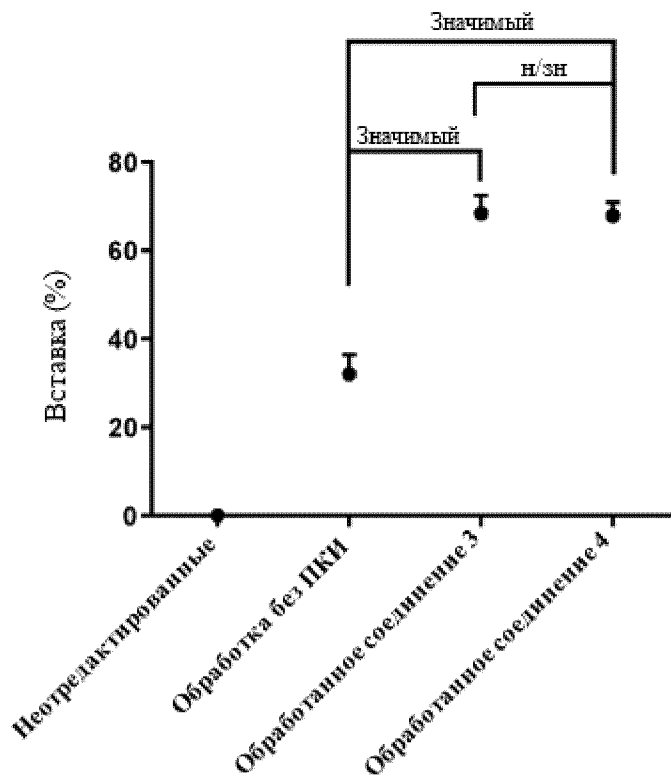
Фиг. 8А



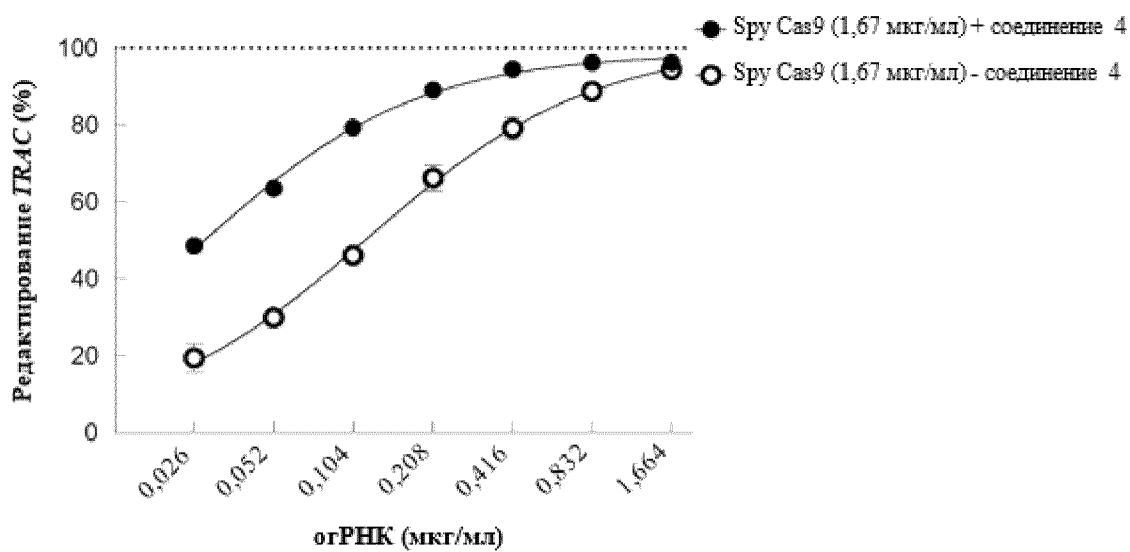
Фиг. 8В



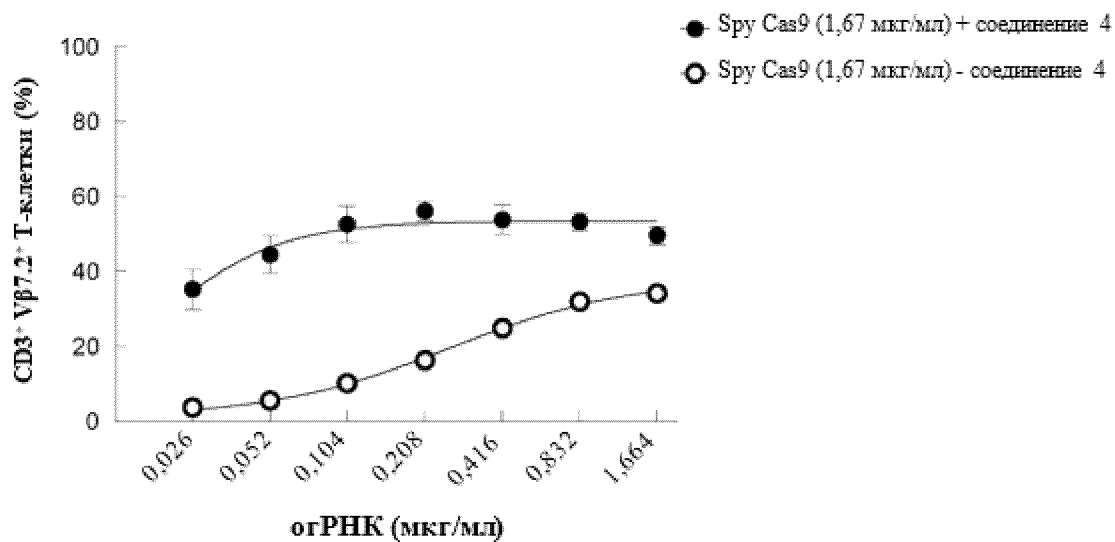
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 10А



Фиг. 10В