

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392924** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.02.16

(22) Дата подачи заявки
2022.04.15

(51) Int. Cl. *A61K 9/127* (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

(31) 63/176,227; 63/254,948; 63/274,153;
63/316,568

(32) 2021.04.17; 2021.10.12; 2021.11.01;
2022.03.04

(33) US

(86) PCT/US2022/025076

(87) WO 2022/221697 2022.10.20

(71) Заявитель:
ИНТЕЛЛИА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
**Свами Арчана, Ракше Вишал,
Продеус Аарон, Маггани Миках,
Пармар Рубина Джаре (US)**

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

(57) В настоящем изобретении предлагаются композиции липидных наночастиц (LNP), состоящие из ионизируемых липидов, вспомогательных липидов, нейтральных липидов и PEG-липидов, пригодных для доставки биологически активных агентов, например доставки биологически активных агентов в клетки для получения сконструированных клеток. Описанные в данном документе композиции LNP применимы в способах редактирования генов, способах доставки биологически активного агента и способах модификации или расщепления ДНК.

A1

202392924

202392924

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579867EA/032

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка испрашивает преимущество приоритета по отношению к предварительной заявке на патент США № 63/176227, поданной 17 апреля 2021 г.; предварительной заявке на патент США № 63/254948, поданной 12 октября 2021 г.; предварительной заявке на патент США № 63/274153, поданной 1 ноября 2021 г.; и предварительной заявке на патент США № 63/316568, поданной 4 марта 2022 г., полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Липидные наночастицы, составленные с ионизируемыми липидами, могут служить в качестве носителей груза для доставки в клетки биологически активных средств, в частности, полинуклеотидов, таких как РНК, включая мРНК и гидовые РНК. Композиции LNP, содержащие ионизируемые липиды облегчают доставку олигонуклеотидных агентов через клеточные мембраны, и могут применяться для введения компонентов и композиций для редактирования генов в живые клетки. Биологически активные агенты, которые особенно трудно доставить в клетки, включают белки, лекарственные средства на основе нуклеиновых кислот и их производные, в частности, лекарственные средства, которые включают относительно большие олигонуклеотиды, такие как мРНК. Особый интерес представляют композиции для доставки в клетки перспективных технологий редактирования генов, например, для доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 (например, мРНК, кодирующие нуклеазу и ассоциированную с ней гидовую РНК (gРНК)).

Существует потребность в композициях для улучшенной доставки нуклеиновых кислот, таких как РНК, *in vivo* и *in vitro*. В качестве примера можно привести композиции для доставки компонентов CRISPR/Cas в эукариотическую клетку, например, в клетку человека. В частности, особый интерес представляют композиции для доставки мРНК, кодирующей белковый компонент CRISPR, и для доставки гидовых РНК CRISPR. Композиции с полезными свойствами для доставки *in vitro* и *in vivo*, которые могут стабилизировать и доставлять РНК-компоненты, также представляют особый интерес.

Краткое описание сущности изобретения

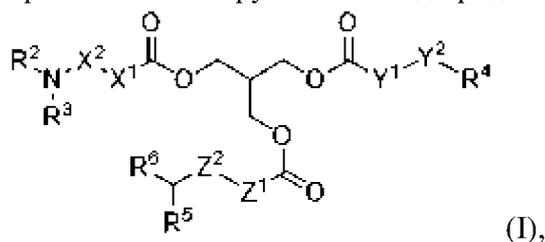
В настоящем изобретении предлагаются липидные композиции (например, композиции на основе липидных наночастиц (LNP)). Такие липидные композиции могут обладать свойствами, благоприятными для доставки в клетки биологических агентов, включая, например, грузы нуклеиновых кислот, такие как компоненты редактирования генов CRISPR/Cas.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция LNP содержит:

компонент, являющийся нуклеиновой кислотой; и

липидный компонент, при этом липидный компонент содержит:

- ионизируемый липид в количестве от около 25-45 моль % от липидного компонента;
 - нейтральный липид в количестве от около 10-30 моль % от липидного компонента;
 - вспомогательный липид в количестве от около 25-65 моль % от липидного компонента; и
 - PEG-липид в количестве от около 1,5-3,5 моль % от липидного компонента;
- при этом ионизируемый липид представляет собой соединение Формулы (I)



где

X^1 представляет собой O, NH или прямую связь;

X^2 представляет собой C_{2-3} алкилен;

R^3 представляет собой C_{1-3} алкил;

R^2 представляет собой C_{1-3} алкил, или

R^2 вместе с атомом азота, к которому он присоединен, и 2-3 атомами углерода X^2 образуют 5- или 6-членное кольцо, или

R^2 и R^3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо;

Y^1 представляет собой C_{6-10} алкилен;

Y^2 выбран из ;

R^4 представляет собой C_{4-11} алкил;

Z^1 представляет собой C_{2-5} алкилен;

Z^2 представляет собой или отсутствует;

R^5 представляет собой C_{6-8} алкил, C_{5-10} алкокси (например, $-OC_{5-10}$ галоалкил), $-O(C_{2-3}$ алкил) OC_{6-10} алкил, $-OC_{6-10}$ алкенил (например, $-OC_{6-10}$ разветвленный алкенил), или $-OC_{6-10}$ алкинил, и

R^6 представляет собой C_{6-8} алкил, C_{5-10} алкокси (например, $-OC_{5-10}$ галоалкил), $-O(C_{2-3}$ алкил) OC_{6-10} алкил, $-OC_{6-10}$ алкенил (например, $-OC_{6-10}$ разветвленный алкенил), или $-OC_{6-10}$ алкинил, или

R^5 вместе с R^6 образуют 6-членный циклический ацеталь, замещенный геминальным C_{6-8} алкилом;

или его соль.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция LNP содержит:

биологически активный агент; и

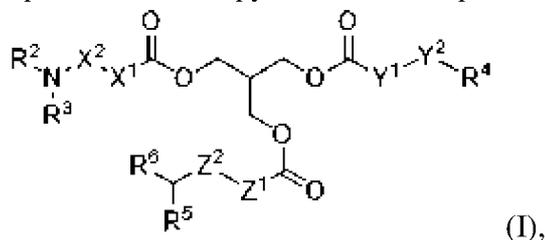
липидный компонент, при этом липидный компонент содержит:

a) ионизируемый липид в количестве от около 25-45 моль % от липидного компонента;

b) нейтральный липид в количестве от около 10-30 моль % от липидного компонента;

c) вспомогательный липид в количестве от около 25-65 моль % от липидного компонента; и

d) PEG-липид в количестве от около 1,5-3,5 моль % от липидного компонента; при этом ионизируемый липид представляет собой соединение Формулы (I)



где

X^1 представляет собой O, NH или прямую связь;

X^2 представляет собой C_{2-3} алкилен;

R^3 представляет собой C_{1-3} алкил;

R^2 представляет собой C_{1-3} алкил, или

R^2 вместе с атомом азота, к которому он присоединен, и 2-3 атомами углерода X^2 образуют 5- или 6-членное кольцо, или

R^2 и R^3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо;

Y^1 представляет собой C_{6-10} алкилен;

Y^2 выбран из , и ;

R^4 представляет собой C_{4-11} алкил;

Z^1 представляет собой C_{2-5} алкилен;

Z^2 представляет собой или отсутствует;

R^5 представляет собой C_{6-8} алкил или C_{6-8} алкокси; и

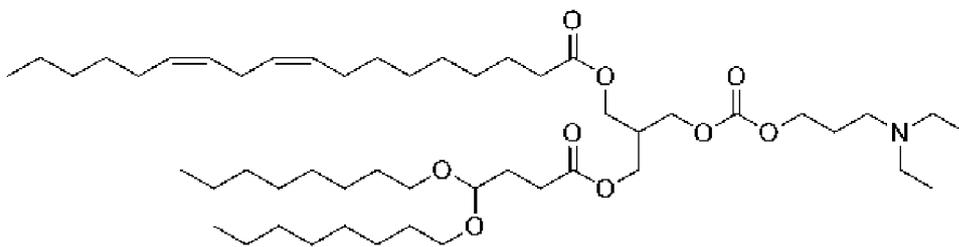
R^6 представляет собой C_{6-8} алкил или C_{6-8} алкокси или его соль.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество

ионизируемого липида составляет около 29-44 моль % от липидного компонента, количество нейтрального липида - около 11-28 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида - около 28-55 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов - около 2,3-3,5 моль % от липидного компонента.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 33 моль % от липидного компонента, количество нейтрального липида - около 15 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида - около 49 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов - около 3 моль % от липидного компонента.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения ионизируемый липид представляет собой



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

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Z-средний диаметр LNP составляет менее 145 нм, например, менее 120 нм, менее 115 нм или менее 100 нм. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения среднечисловой диаметр LNP составляет более 50 нм, например, более 60 нм.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют индекс полидисперсности от около 0,005 до около 0,75, например, от около 0,005 до около 0,1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение N/P композиции LNP составляет от около 5 до около 7, предпочтительно около 6.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой описанной в данном документе композиции LNP, при этом компонент, являющийся нуклеиновой кислотой, представляет собой РНК-компонент. В некоторых вариантах осуществления РНК-компонент включает мРНК. В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, при этом РНК-компонент включает РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, мРНК нуклеазы Cas, таких как мРНК нуклеазы Cas класса 2 или мРНК нуклеазы Cas9.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, при этом мРНК представляет собой модифицированную мРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, при

этом РНК-компонент включает нуклеиновую кислоту gРНК. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, при этом нуклеиновая кислота gРНК представляет собой gРНК.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой РНК-компонент включает mРНК нуклеазы Cas класса 2 и gРНК. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, при этом нуклеиновая кислота gРНК представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (dgРНК). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, при этом нуклеиновая кислота gРНК представляет собой или кодирует одинарную гидовую РНК (sgРНК).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к описанной в данном документе композиции LNP, включающей нуклеиновую кислоту гидовой РНК и mРНК нуклеазы Cas класса 2, при этом соотношение mРНК и нуклеиновой кислоты гидовой РНК составляет от около 2:1 до 1:4 по массе, предпочтительно около 1:1 по массе.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, при этом gРНК представляет собой модифицированную gРНК, например, модифицированная gРНК включает модификацию одного или большего количества из первых пяти нуклеотидов на 5' конце, или модифицированная gРНК включает модификацию одного или большего количества из последних пяти нуклеотидов на 3' конце, или обе модификации.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу доставки биологически активного агента в клетку, включающему приведение клетки в контакт с композицией LNP, описанной в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу расщепления ДНК, включающему приведение клетки в контакт с композицией LNP, описанной в данном документе. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения этап расщепления включает введение разреза одноцепочечной ДНК. В других вариантах осуществления настоящего изобретения этап расщепления включает введение разрыва двухцепочечной ДНК. В определенных вариантах осуществления композиция LNP включает mРНК Cas класса 2 и нуклеиновую кислоту gРНК. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения описанные способы включают введение в клетку по меньшей мере одной матричной нуклеиновой кислоты.

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 настоящего изобретения описанный способ включает введение

композиции LNP в клетку, например, эукариотическую, в частности, человеческую. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой тип клеток, пригодных для терапии, например, адоптивной клеточной терапии (АСТ). Примерами АСТ являются терапия с применением аутологичных клеток и терапия с применением аллогенных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой стволовую клетку, такую как гемопоэтическая стволовая клетка, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка или другая мультипотентная или плюрипотентная клетка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой стволовую клетку, например, мезенхимальную стволовую клетку, которая может развиваться в костную, хрящевую, мышечную или жировую клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают глазные стволовые клетки. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения клетку выбирают 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 настоящего изобретения клетка представляет собой клетку печени. В других вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой иммунную клетку, например, лейкоцит или лимфоцит, предпочтительно лимфоцит, еще более предпочтительно Т-клетку, В-клетку или NK-клетку, наиболее предпочтительно активированную Т-клетку или неактивированную Т-клетку.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому описанному в данном документе способу редактирования генов, включающему введение мРНК в составе первой композиции LNP и второй композиции LNP, включающей один или большее количество из следующих агентов: мРНК, гРНК и нуклеиновая кислота гРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первую и вторую композиции LNP вводят одновременно. В других вариантах осуществления настоящего изобретения первую и вторую композиции LNP вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мРНК и нуклеиновая кислота гРНК объединены в одной композиции LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая композиция LNP содержит первую гРНК, а вторая композиция LNP - вторую гРНК, при этом первая и вторая гРНК содержат разные гидовые последовательности, комплементарные разным мишеням.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому описанному в данном документе способу редактирования генов, при котором клетка контактирует с композицией LNP *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления

настоящее изобретение относится к любому описанному в данном документе способу редактирования генов, при котором клетка контактирует с композицией LNP *ex vivo*. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому описанному в данном документе способу редактирования генов, включающему приведение в контакт ткани животного с LNP.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому способу редактирования гена, описанному в данном документе, при котором редактирование гена приводит к нокауту гена.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к любому способу редактирования гена, описанному в данном документе, при котором редактирование гена приводит к коррекции гена.

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

В настоящем изобретении предлагаются способы генетической инженерии Т-клеток *in vitro*, позволяющие преодолеть трудности, характерные для предшествующих процессов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения наивные Т-клетки контактируют *in vitro* по меньшей мере с одной липидной композицией и генетически модифицируются. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения неактивированные Т-клетки контактируют *in vitro* с двумя или большим количеством липидных композиций и генетически модифицируются. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активированные Т-клетки контактируют *in vitro* с двумя или большим количеством липидных композиций и генетически модифицируются. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетки модифицируются на этапе предварительной активации, включающем приведение в контакт (неактивированной) Т-клетки с одной или большим количеством липидных композиций, с последующей активацией Т-клетки и дальнейшей модификацией Т-клетки на этапе пост-активации, включающем приведение в контакт активированной Т-клетки с одной или большим количеством липидных композиций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения неактивированные Т-клетки контактируют с одной, двумя или тремя липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активированная Т-клетка контактирует с от одной до двенадцати липидных композиций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активированная Т-клетка контактирует с от одной до восьми липидных композиций, предпочтительно от одной до четырех липидных композиций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активированная Т-клетка контактирует с от одной до шести липидных композиций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка контактирует с двумя липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка

контактирует с тремя липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка контактирует с четырьмя липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка контактирует с пятью липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетка контактирует с шестью липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка контактирует с семью липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка контактирует с восемью липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетка контактирует с девятью липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка контактирует с десятью липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка контактирует с одиннадцатью липидными композициями. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетка контактирует с двенадцатью липидными композициями. Такое типовое последовательное введение (необязательно с дальнейшим последовательным или одновременным введением на этапах пре- и пост-активации) липидных композиций обеспечивает преимущество активационного состояния Т-клетки и обеспечивает уникальные преимущества и более здоровые клетки на этапе пост-редактирования. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генно-инженерные Т-клетки обладают такими преимуществами, как высокая эффективность редактирования в каждом целевом сайте, повышенная выживаемость после редактирования, низкая токсичность, несмотря на множественность трансфекций, низкий уровень транслокаций (например, отсутствие измеримых транслокаций мишень-мишень), повышенная продукция цитокинов (например, IL-2, IFN γ , TNF α), продолжение пролиферации при повторной стимуляции (например, при повторной стимуляции антигеном), повышенная экспансия и/или экспрессия маркеров фенотипа клеток памяти, включая, например, ранние стволовые клетки.

Краткое описание графических материалов

На Фигуре 1А представлен график процентного содержания CD3-клеток после доставки mРНК Cas9 и sgРНК в активированные CD3+ Т-клетки с помощью композиций LNP с Соединением 6 при различных соотношениях липидных компонентов.

На Фигуре 1В представлен график процентного содержания CD3-клеток после доставки mРНК Cas9 и sgРНК в неактивированные CD3+ Т-клетки с помощью композиций LNP с Соединением 6 при различных соотношениях липидных компонентов.

На Фигуре 2А представлен график процентного содержания CD3-клеток после доставки mРНК Cas9 и sgРНК в активированные CD3+ Т-клетки с помощью композиций LNP с Соединением 6 при различных соотношениях липидных компонентов.

На Фигуре 2В представлен график процентного содержания CD3-клеток после доставки mРНК Cas9 и sgРНК в неактивированные CD3+ Т-клетки с помощью композиций LNP с Соединением 6 при различных соотношениях липидных компонентов.

На Фигуре 3А представлен график процентного содержания CD3-клеток после

доставки mРНК Cas9 и sgРНК в активированные CD3⁺ Т-клетки с помощью композиций LNP с Соединением 6, Соединением 8 и Соединением 11, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP с Соединением 6, Соединением 8 и Соединением 11, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 3В представлен график процентного содержания CD3-клеток после доставки mРНК Cas9 и sgРНК в неактивированные CD3⁺ Т-клетки с помощью композиций LNP с Соединением 6 Соединением 8 и Соединением 11, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP с Соединением 6, Соединением 8 и Соединением 11, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 4А представлен график, отражающий влияние различных соотношений sgРНК и mРНК Cas9 на процент CD3-клеток после доставки mРНК Cas9 и sgРНК в активированные CD3⁺ Т-клетки с помощью композиций LNP с Соединением 6 имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 4В представлен график, отражающий влияние различных соотношений sgРНК и mРНК Cas9 на процент CD3-клеток после доставки mРНК Cas9 и sgРНК в неактивированные CD3⁺ Т-клетки от двух различных доноров с помощью композиций LNP с Соединением 6, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 5 представлен график, отражающий влияние различных условий сывороточной среды на эффективность вставки GFP в активированные CD3⁺ Т-клетки после доставки mРНК Cas9 и sgРНК с помощью композиций LNP с Соединением 6, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 6А представлен график, отражающий влияние различных концентраций композиции LNP на процентное содержание CD3-клеток после доставки mРНК Cas9 и sgРНК, нацеленных на TRAC, в активированные Т-клетки с помощью композиций LNP,

имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 6B представлен график, отражающий влияние различных концентраций композиции LNP на процентное содержание HLA-DR-, HLA-DP-, HLA-DQ-клеток после доставки mPHK Cas9 и sgPHK, нацеленных на СИТА, в активированные Т-клетки с помощью композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 6C представлен график, отражающий влияние различных концентраций композиции LNP на процентное содержание CD3-клеток после доставки mPHK Cas9 и sgPHK, нацеленных на TRBC, в активированные Т-клетки с помощью композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 6D представлен график, отражающий влияние различных концентраций композиции LNP на процент HLA-A-клеток после доставки mPHK Cas9 и sgPHK нацеленной на HLA-A, в активированные Т-клетки с помощью композиций LNP с номинальным моль% соотношением липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 7A представлен график, отражающий уровень редактирования каждого из HLA-A, СИТА, TCR и WT1 в CD8+ Т-клетках после доставки mPHK Cas9 и sgPHK, нацеленных на локусы СИТА, HLA-A, TRAC и TRBC, с помощью композиций LNP в концентрациях 0,65 мкг/мл или 2,5 мкг/мл, при этом композиции LNP имеют номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительные композиции LNP с номинальным моль% соотношением липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG, а также отрицательного контроля.

На Фигуре 7B представлен график, отражающий комбинированную скорость редактирования HLA-A, СИТА, TCR и WT1 в CD8+ Т-клетках после доставки mPHK Cas9 и sgPHK, нацеленных на локусы СИТА, HLA-A, TRAC и TRBC, с помощью композиций LNP в концентрациях 0,65 мкг/мл или 2,5 мкг/мл, при этом композиции LNP имеют номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP,

имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG, а также отрицательный контроль.

На Фигуре 8 представлен график, отражающий влияние различных концентраций композиции LNP на процент редактирования после доставки mPНК Cas9 и sgPНК, нацеленных на AAVS1, в НК-клетки с помощью композиций LNP с номинальным моль% соотношением липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 9А представлен график, отражающий влияние различных концентраций композиции LNP на процент редактирования после доставки mPНК Cas9 и sgPНК, нацеленных на AAVS1 в моноциты с помощью композиций LNP имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 9В представлен график, отражающий влияние различных концентраций композиции LNP на процент редактирования после доставки mPНК Cas9 и sgPНК, нацеленных на AAVS1, в макрофаги с помощью композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

На Фигуре 10 представлен график, отражающий влияние различных концентраций композиции LNP на процент редактирования после доставки mPНК Cas9 и sgPНК, нацеленных на AAVS1, в В-клетки с помощью композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и сравнительных композиций LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG.

Подробное описание сущности изобретения

В настоящем изобретении предлагаются липидные композиции для доставки биологически активных агентов, в том числе нуклеиновых кислот, таких как CRISPR/Cas-компонентные PНК (mPНК и/или gPНК) («груз»), в клетку, а также способы приготовления и применения таких композиций. Такие липидные композиции включают ионизируемый липид, нейтральный липид, PEG-липид и вспомогательный липид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ионизируемый липид представляет собой соединение Формулы (I) или (II), как определено в данном документе. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в состав липидных

композиций может входить биологически активный агент, например, РНК-компонент. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-компонент содержит мРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мРНК представляет собой мРНК, кодирующую нуклеазу Cas класса 2. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-компонент содержит gРНК и необязательно мРНК, кодирующую нуклеазу Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения липидные композиции представляют собой композиции на основе липидных наночастиц (LNP). «Липидная наночастица» или «LNP» означает, без ограничения смысла, частицу, состоящую из множества (т.е. более чем одного) липидных компонентов, физически связанных друг с другом межмолекулярными силами.

Также предлагаются способы редактирования генов и способы создания инженерных клеток с применением этих липидных композиций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP могут быть применены для доставки биологически активного агента в клетку, ткань или животное. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой эукариотическую клетку, в частности, клетку человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой клетку печени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой тип клеток, пригодных для терапии, например, адоптивной клеточной терапии (АСТ), такой как терапия с применением аутологичных клеток и терапия с применением аллогенных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой стволовую клетку, такую как гемопоэтическая стволовая клетка, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка или другая мультипотентная или плюрипотентная клетка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой стволовую клетку, например, мезенхимальную стволовую клетку, которая может развиваться в костную, хрящевую, мышечную или жировую клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают глазные стволовые клетки. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения клетку выбирают из мезенхимальных стволовых клеток, гемопоэтических стволовых клеток (HSC), мононуклеарных клеток, эндотелиальных прогениторных клеток (EPC), нейральных 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 некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой иммунную клетку, такую как лейкоцит или лимфоцит. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения иммунная клетка представляет собой лимфоцит. В определенных вариантах осуществления настоящего

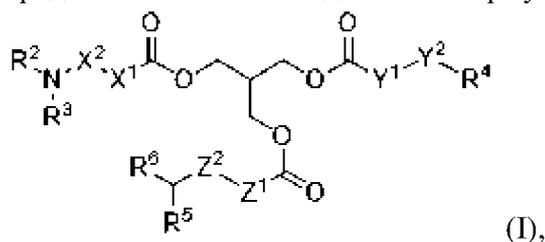
изобретения лимфоцит представляет собой Т-клетку, В-клетку или НК-клетку. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения лимфоцит представляет собой Т-клетку. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения лимфоцит представляет собой активированную Т-клетку. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения лимфоцит представляет собой неактивированную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP и способы, описанные в данном документе, приводят к эффективности редактирования более чем на 80%, более чем на 90% или более чем на 95%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность редактирования композиций LNP и способов, составляет около 80-95%, около 90-95%, около 80-99%, около 90-99% или около 95-99%.

Ионизируемые липиды

В настоящем изобретении предлагаются ионизируемые липиды, которые могут быть применены в композициях LNP.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ионизируемый липид представляет собой соединение Формулы (I)



где

X¹ представляет собой O, NH или прямую связь;

X² представляет собой C₂₋₃ алкилен;

R³ представляет собой C₁₋₃ алкил;

R² представляет собой C₁₋₃ алкил, или

R² вместе с атомом азота, к которому он присоединен, и 2-3 атомами углерода X² образуют 5- или 6-членное кольцо, или

R² и R³ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо;

Y¹ представляет собой C₆₋₁₀ алкилен;

Y² выбран из ;

R⁴ представляет собой C₄₋₁₁ алкил;

Z¹ представляет собой C₂₋₅ алкилен;

Z² представляет собой или отсутствует;

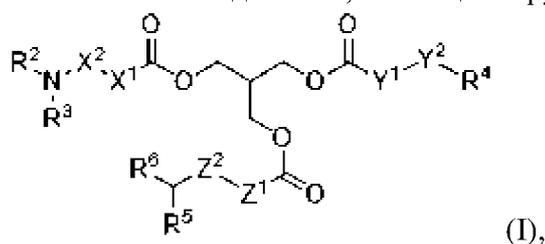
R^5 представляет собой C_{6-8} алкил, C_{5-10} алкокси (например, $-OC_{5-10}$ галоалкил), $-O(C_{2-3}$ алкил) OC_{6-10} алкил, $-OC_{6-10}$ алкенил (например, $-OC_{6-10}$ разветвленный алкенил), или $-OC_{6-10}$ алкинил, и

R^6 представляет собой C_{6-8} алкил, C_{5-10} алкокси (например, $-OC_{5-10}$ галоалкил), $-O(C_{2-3}$ алкил) OC_{6-10} алкил, $-OC_{6-10}$ алкенил (например, $-OC_{6-10}$ разветвленный алкенил), или $-OC_{6-10}$ алкинил, или

R^5 вместе с R^6 образуют 6-членный циклический ацеталь, замещенный геминальным C_{6-8} алкилом;

или его соль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ионизируемый липид представляет собой соединение, имеющее структуру Формулы I



где

X^1 представляет собой O, NH или прямую связь;

X^2 представляет собой C_{2-3} алкилен;

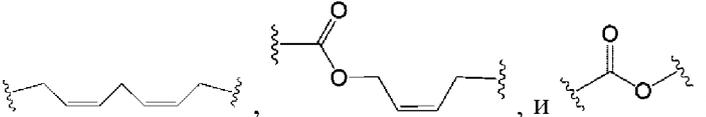
R^3 представляет собой C_{1-3} алкил;

R^2 представляет собой C_{1-3} алкил, или

R^2 вместе с атомом азота, к которому он присоединен, и 2-3 атомами углерода X^2 образуют 5- или 6-членное кольцо, или

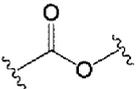
R^2 и R^3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо;

Y^1 представляет собой C_{6-10} алкилен;

Y^2 выбран из  ;

R^4 представляет собой C_{4-11} алкил;

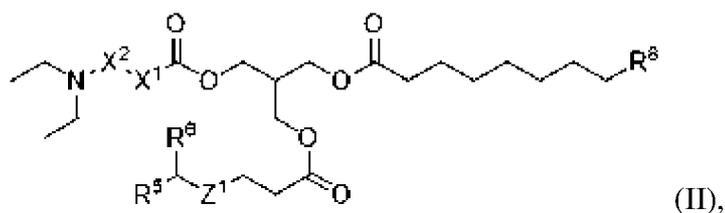
Z^1 представляет собой C_{2-5} алкилен;

Z^2 представляет собой  или отсутствует;

R^5 представляет собой C_{6-8} алкил или C_{6-8} алкокси; и

R^6 представляет собой C_{6-8} алкил или C_{6-8} алкокси или его соль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ионизируемый липид представляет собой соединение Формулы (II)

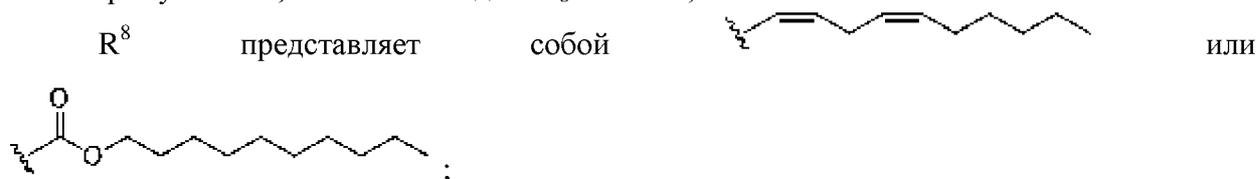


где

X^1 представляет собой O, NH или прямую связь;

X^2 представляет собой C_{2-3} алкилен;

Z^1 представляет собой C_3 алкилен, а R^5 и R^6 каждый C_6 алкил, или Z^1 представляет собой прямую связь, а R^5 и R^6 каждый C_8 алкокси; и



или его соль.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения X^1 представляет собой O. В других вариантах осуществления настоящего изобретения X^1 представляет собой NH. В еще других вариантах осуществления настоящего изобретения X^1 представляет собой прямую связь.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения X^2 представляет собой C_3 алкилен. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения X^2 представляет собой C_2 алкилен.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Z^1 представляет собой прямую связь, а R^5 и R^6 каждый из C_8 алкокси. В других вариантах осуществления настоящего изобретения Z^1 представляет собой C_3 алкилен, а R^5 и R^6 каждый C_6 алкил.

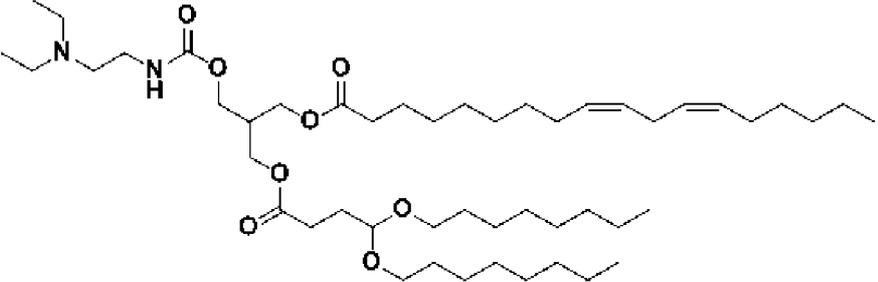
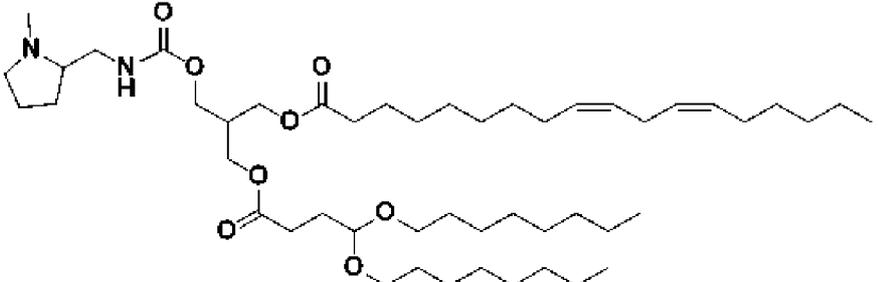
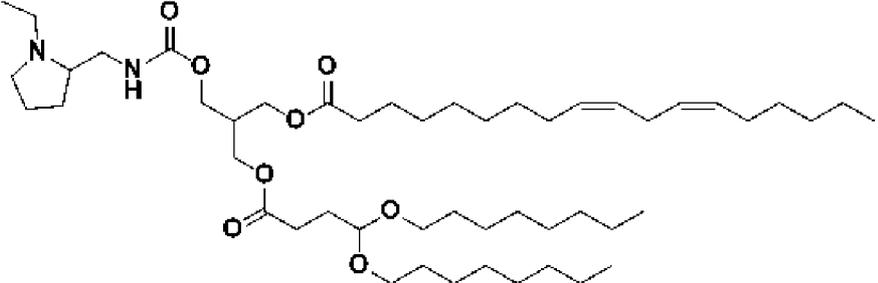
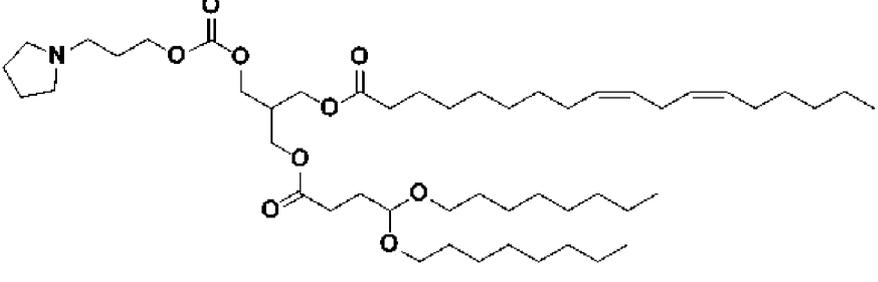
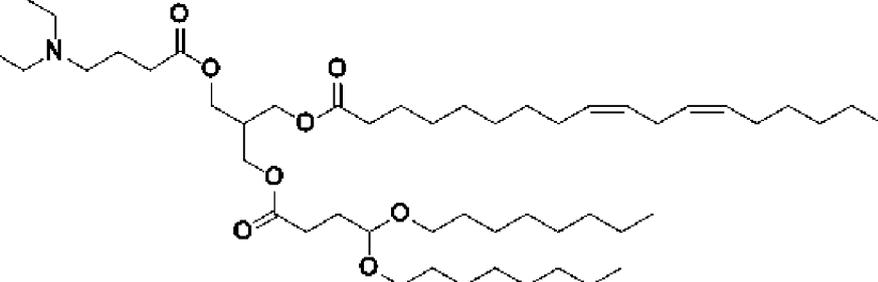
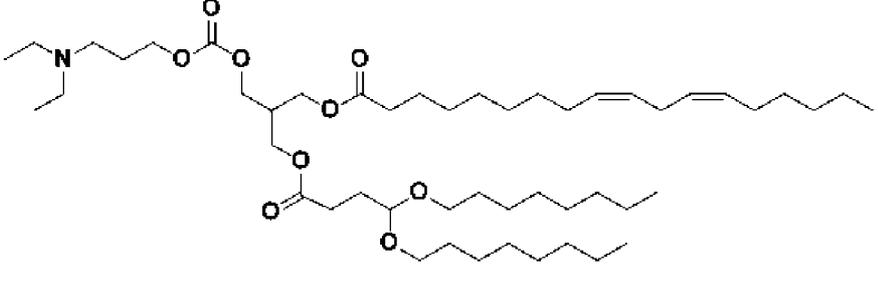
В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения R^8 представляет собой . В других вариантах осуществления

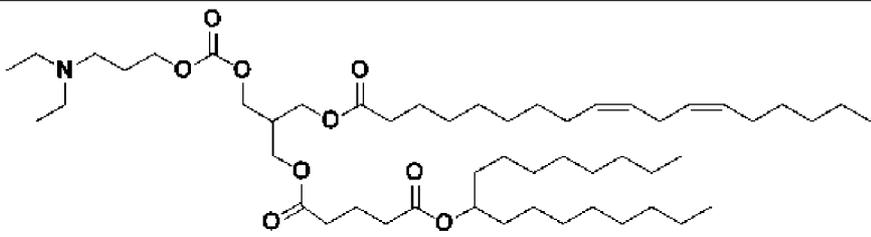
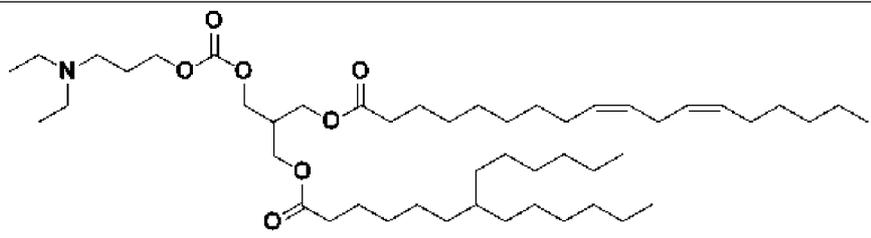
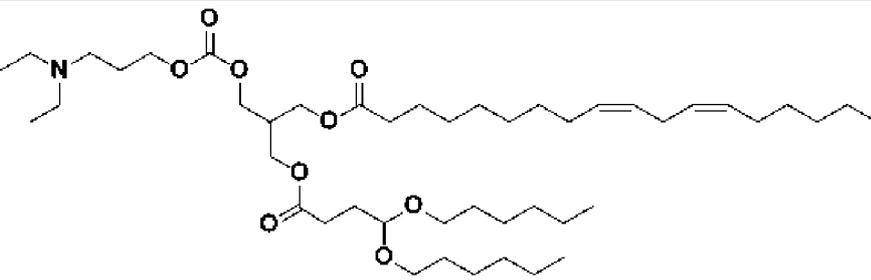
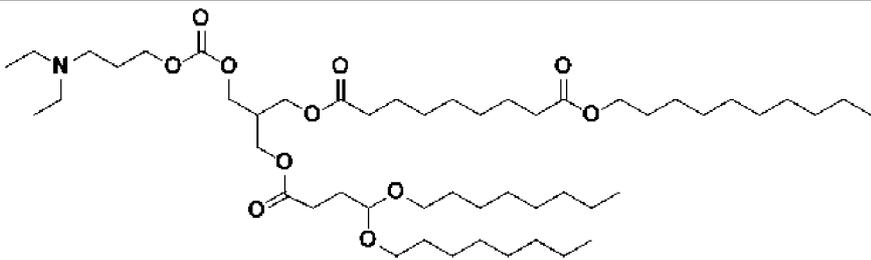
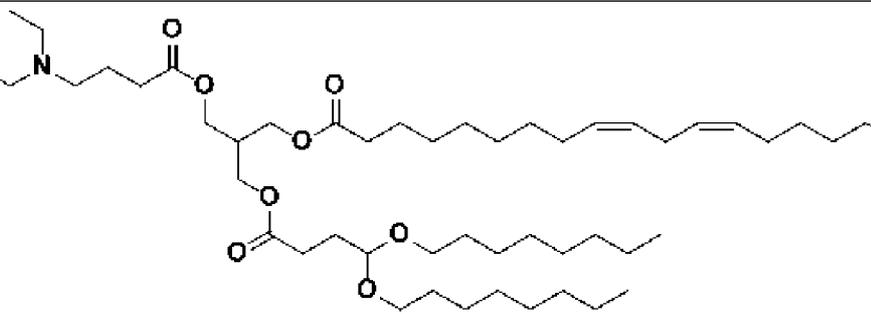
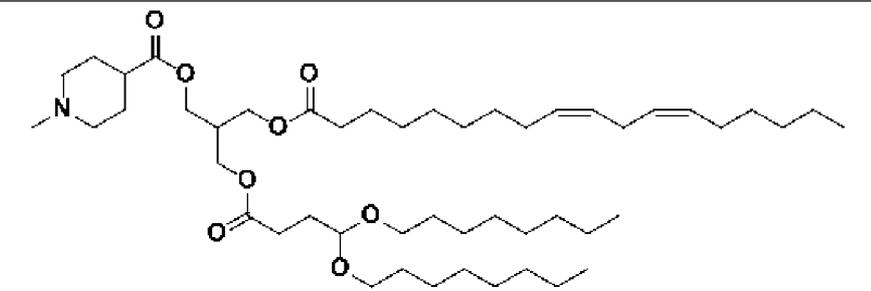
настоящего изобретения R^8 представляет собой .

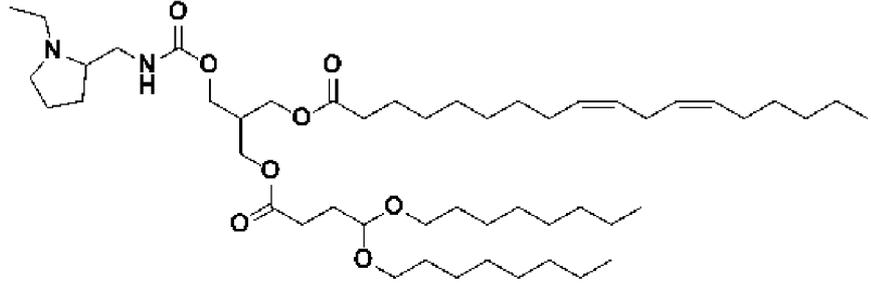
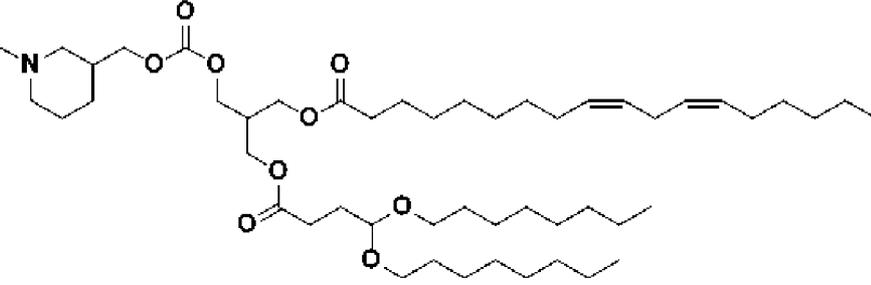
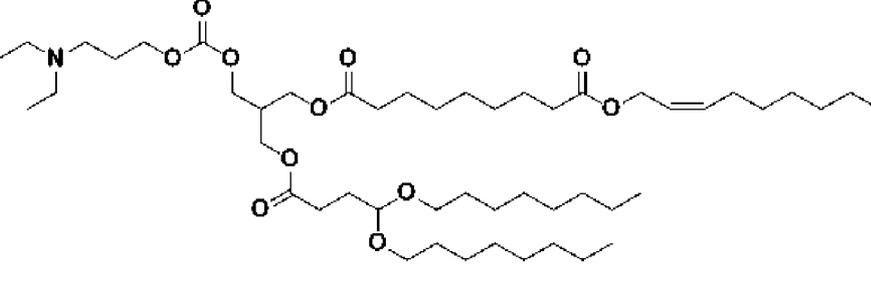
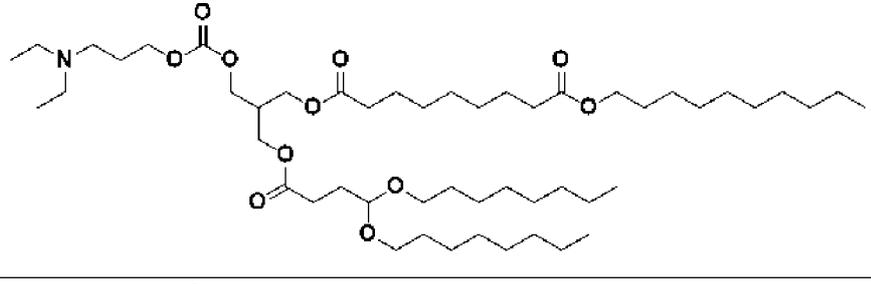
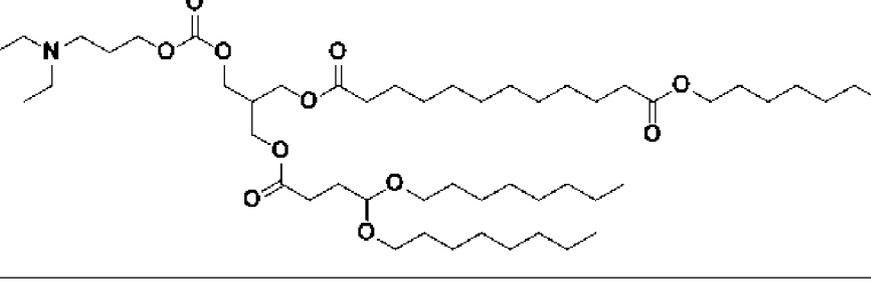
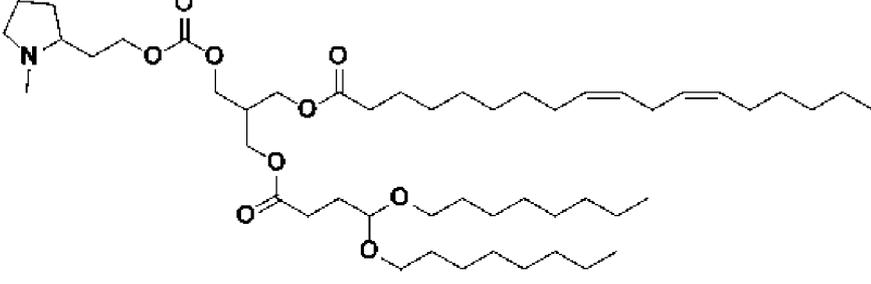
В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения ионизируемый липид представляет собой соль.

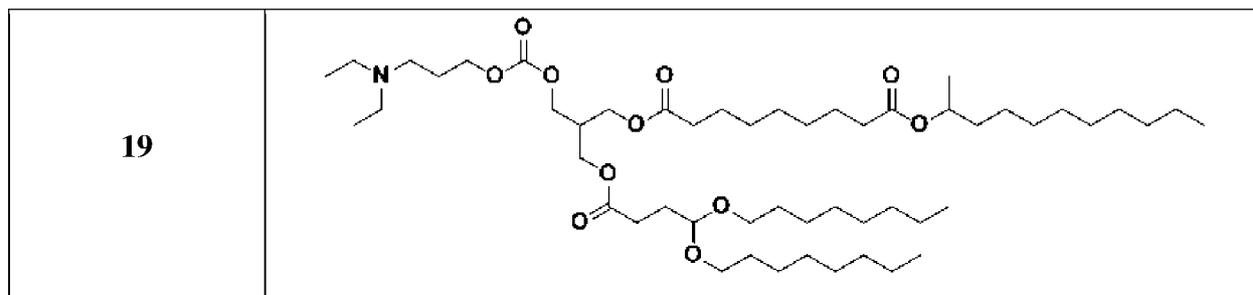
Репрезентативные соединения Формулы (I) включают:

Номер Соединения	Соединение
---------------------	------------

1	
2	
3	
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	
11	
12	

13	
14	
15	
16	
17	
18	



или его соль, такую как фармацевтически приемлемая соль. Соединения могут быть синтезированы в соответствии со способами, изложенными в публикациях WO2015/095340 (*например*, стр. 84-86) и WO2020/219876 (*например*, стр. 87-186), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Соединения Формулы (I) или (II) по настоящему изобретению могут образовывать соли в зависимости от pH среды, в которой они находятся. Например, в слабокислой среде соединения Формулы (I) или (II) могут быть протонированы и, таким образом, нести положительный заряд. И наоборот, в слабощелочной среде, такой как, например, кровь, где pH составляет приблизительно 7,35, соединения Формулы (I) или (II) могут не протонироваться и, таким образом, не несут заряда. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения Формулы (I) или Формулы (II) по настоящему изобретению могут быть преимущественно протонированы при pH по меньшей мере около 9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения Формулы (I) или Формулы (II) по настоящему изобретению могут быть преимущественно протонированы при pH по меньшей мере около 10.

Значение pH, при котором соединение Формулы (I) или (II) преимущественно протонируется, связано с его собственным значением pKa. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль соединения Формулы (I) или (II) по настоящему изобретению имеет 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 настоящего изобретения соль соединения Формулы (I) или (II) по настоящему изобретению имеет 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, от около 6 до около 6,9, от около 6 до около 6,5, от около 6,1 до около 6,9, или от около 6 до около 6,85. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль соединения Формулы (I) или (II) по настоящему изобретению имеет pKa около 6,0, около 6,1, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,6, около 6,7, около 6,8 или около 6,9. В альтернативном варианте соль соединения Формулы (I) или (II) по настоящему изобретению имеет значение pKa в диапазоне от около 6 до около 8. Значение pKa соли соединения формулы(I) или (II) может быть важным фактором при составлении LNP, поскольку было обнаружено, что LNP, составленные с определенными липидами, имеющими pKa в диапазоне от около 5,5 до около 7,0, являются эффективными для доставки груза *in vivo*, *например*, в печень. Кроме того, было обнаружено, что LNP, составленные с определенными липидами, имеющими pKa в диапазоне от около 5,3 до около 6,4,

являются эффективными для доставки *in vivo*, например, в опухоли. См., например, WO 2014/136086. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ионизируемые липиды имеют положительный заряд при кислом pH, 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, помимо прочего, 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-дизэйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC), пальмитоилолеил фосфатидилхолин (POPC), лизофосфатидилхолин, диолеил фосфатидилэтаноламин (DOPE), дилинолеилфосфатидилхолин дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин (POPE), лизофосфатидилэтаноламин и их комбинации. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения нейтральный фосфолипид может быть выбран из дистеароилфосфатидилхолина (DSPC) и димиристоилфосфатидилэтаноламина (DMPE), предпочтительно дистеароилфосфатидилхолина (DSPC).

«Вспомогательные липиды» включают стероиды, стерины и алкилрезорцины. Вспомогательные липиды, пригодные для применения в настоящем изобретении, включают, помимо прочего, холестерин, 5-гептадецилрезорцин и гемисукцинат холестерина. В определенных вариантах осуществления вспомогательный липид может представлять собой холестерин или его производное, такое как гемисукцинат холестерина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 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 с соединением Формулы (I) или (II) 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»), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения PEG-фрагмент является незамещенным. В альтернативном варианте 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. Milton Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1992)); в альтернативном варианте PEG-фрагмент может представлять собой гомополимер PEG. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-фрагмент имеет молекулярную массу от около 130 до около 50000, например, от около 150 до около 30000 или даже от около 150 до около 20000. Подобным образом, PEG-фрагмент может иметь молекулярную массу от около 150 до около 15000, от около 150 до около 10000, от около 150 до около 6000 или даже от около 150 до около 5000. В определенных предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-фрагмент имеет молекулярную массу 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 настоящего изобретения PEG-фрагмент представляет собой «PEG-2K», также называемый «PEG 2000», который имеет среднюю молекулярную массу 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 среднечисловая степень полимеризации составляет около 23 субъединиц ($n=23$) и/или 68 субъединиц ($n=68$). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения n может варьироваться от около 30 до около 60. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения n может варьироваться от около 35 до около 55. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения n может варьироваться от около 40 до около 50. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения n может варьироваться от около 42 до около 48. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения n может составлять 45. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения R может быть выбран из H, замещенного алкила и незамещенного алкила. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения R может представлять собой незамещенный алкил, такой как метил.

В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, 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'-диоксооктанил] карбамоил-[омега] метилполи(этиленгликоль), PEG-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполи(этиленгликолевый) эфир), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG2k-DMPE), 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-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль (PEG2k-DSG; GS-020, NOF Токио, Япония), поли(этиленгликоль)-2000-диметакрилат (PEG2k-DMA) и 1,2-дистеарилоксипропил-3-амин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG2k-DSA). В определенных таких вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-DMG. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-DSG. В других вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-DSPE. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-DMA. В еще других вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-C-DMA. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой соединение S027, описанное в WO2016/010840 (абзацы [00240]-[00244]). В некоторых вариантах

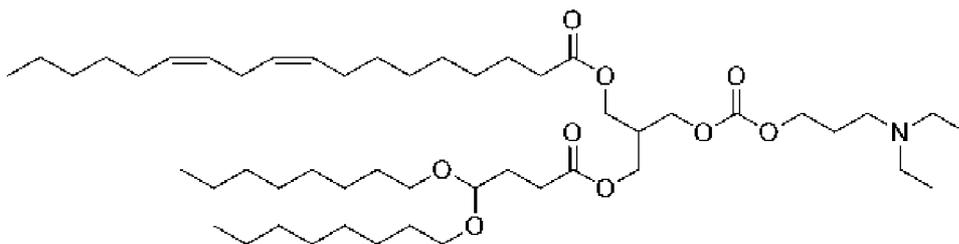
осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-DSA. В других вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-C11. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-C14. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-C16. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид может представлять собой PEG2k-C18.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид включает глицириновую группу. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид включает димиристоилглицириновую (DMG) группу. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид содержит PEG-2k. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид представляет собой PEG-DMG. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид представляет собой а PEG-2k-DMG. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-2k-DMG представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

Липидные композиции

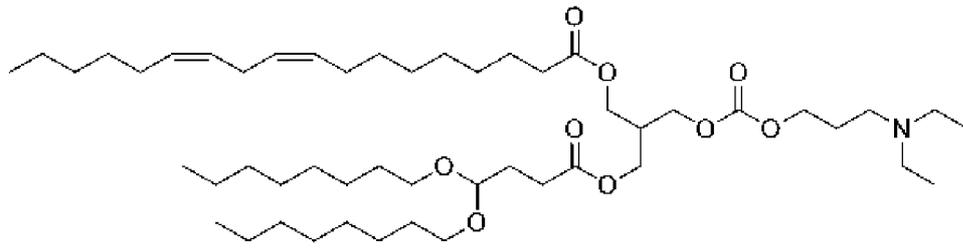
В настоящем документе описаны липидные композиции, содержащие по меньшей мере одно соединение Формулы (I) или (II) или его соль (например, фармацевтически приемлемую соль), по меньшей мере один вспомогательный липид, по меньшей мере один нейтральный липид и по меньшей мере один полимерный липид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция содержит по меньшей мере одно соединение Формулы (I) или (II) или его соль, по меньшей мере один нейтральный липид, по меньшей мере один вспомогательный липид и по меньшей мере один PEG-липид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нейтральный липид представляет собой DSPC или DPME. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вспомогательный липид представляет собой холестерин, 5-гептадецилрезорцин, или гемисукцинат холестерина.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения ионизируемый липид представляет собой



В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения нейтральный липид представляет собой DSPC. В предпочтительных вариантах

осуществления настоящего изобретения вспомогательный липид представляет собой холестерин. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000. В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения липидная композиция дополнительно содержит один или большее количество дополнительных липидных компонентов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция представлена в виде липосомы. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция представлена в виде липидной наночастицы (LNP). В определенных вариантах осуществления изобретения липидная композиция пригодна для доставки *in vivo*. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция пригодна для доставки в орган, например, в печень. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция пригодна для доставки в ткань *ex vivo*. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция пригодна для доставки в клетку *in vitro*.

Липидные композиции, содержащие липиды Формулы (I) или (II) или их фармацевтически приемлемую соль, могут быть представлены в различных формах, включая, помимо прочего, 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 агентами являются нуклеиновые кислоты, такие как РНК. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения биологически активный агент выбирают из мРНК и gРНК. gРНК может представлять собой dgРНК или sgРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения груз включает мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, нуклеазу Cas, нуклеазу Cas класса 2 или Cas9), gРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую gРНК, или комбинацию мРНК

и gРНК.

Типовые соединения Формулы (I) или (II) для применения в указанных липидных композициях приведены в публикации WO2020/219876, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 1. В определенных вариантах осуществления соединения Формулы (I) представляет собой Соединение 2. В определенных вариантах осуществления соединения Формулы (I) представляет собой Соединение 3. В определенных вариантах осуществления соединения Формулы (I) представляет собой Соединение 4. В определенных вариантах осуществления соединения Формулы (I) представляет собой Соединение 5. В определенных вариантах осуществления соединения Формулы (I) представляет собой Соединение 6. В определенных вариантах осуществления соединения Формулы (I) представляет собой соединение 7. В определенных вариантах осуществления соединения формулы (I) представляет собой Соединение 8. В определенных вариантах осуществления соединения формулы (I) представляет собой Соединение 9. В определенных вариантах осуществления соединения формулы (I) представляет собой Соединение 10. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 11. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 12. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 13. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 14. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 15. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 16. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 17. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 18. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение Формулы (I) представляет собой Соединение 19.

Композиции обычно, но не обязательно, включают один или несколько 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 композиции 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 от природы

лекарственной формы.

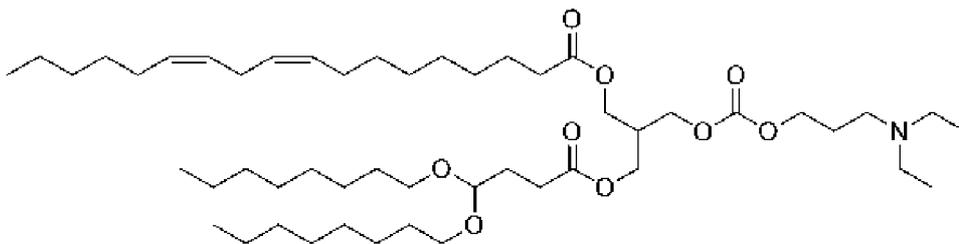
Парентеральные составы обычно представляют собой водные или масляные растворы или суспензии. Если состав является водным, вспомогательные вещества могут представлять собой сахара (включая, помимо прочего, соли глюкозы, маннита, сорбита и т.д.), углеводы и буферные агенты (предпочтительно до pH от 3 до 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 апиrogenная 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 настоящего изобретения 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.

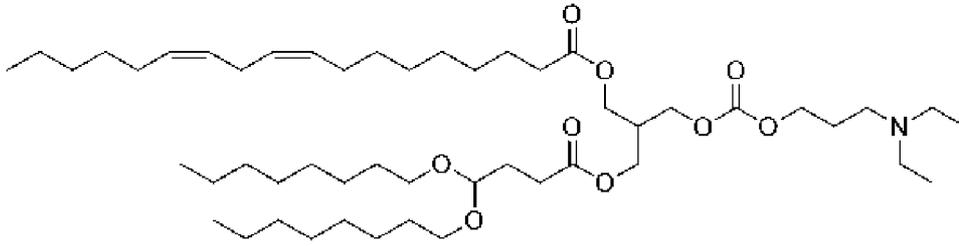
В данном документе описаны композиции LNP, содержащие по меньшей мере одно соединение Формулы (I) или (II), или его соль (например, фармацевтически приемлемую соль), по меньшей мере один вспомогательный липид, по меньшей мере один нейтральный липид и по меньшей мере один полимерный липид. В некоторых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

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения ионизируемый липид представляет собой



В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения нейтральный липид представляет собой DSPC. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения вспомогательный липид представляет собой

холестерин. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000. В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения 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 предлагаются липидные композиции, описанные согласно соответствующим молярным соотношениям компонентов липидов, входящих в состав композиции. Все количества моль % приведены как доля липидного компонента липидной композиции или, более конкретно, композиции LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 % липида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % липида по отношению к липидному компоненту будет составлять ± 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 некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % липидов 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 % липидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество моль % основано на номинальной концентрации. В данном документе под «номинальной концентрацией» понимается концентрация, основанная на исходных количествах веществ, объединенных для получения конечной композиции. Например, если в 1 л воды добавлено 100 мг растворителя, то номинальная концентрация составляет 100 мг/л. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество моль % основано на фактической концентрации, например, на концентрации, определенной аналитическим методом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фактическая концентрация липидов липидного компонента может быть определена, например, с помощью хроматографии, такой как жидкостная хроматография, с последующим применением метода обнаружения, такого как обнаружение заряженных аэрозолей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фактическая концентрация липидов липидного компонента может быть

охарактеризована с помощью липидного анализа, AF4-MALS, NTA и/или крио-ЭМ. Все числа моль % приведены в процентах к содержанию липидов в липидном компоненте.

В вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP описываются согласно соответствующим молярным соотношениям липидов липидного компонента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет от около 25 моль % до около 45 моль %; количество нейтрального липида составляет от около 10 моль % до около 30 моль %; количество вспомогательного липида составляет от около 25 моль % до около 65 моль %; количество PEG-липидов составляет от около 1,5 моль % до около 3,5 моль %. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 29-44 моль % от липидного компонента, количество нейтрального липида составляет около 11-28 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет около 28-55 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет около 2,3-3,5 моль % от липидного компонента. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 29-38 моль % от липидного компонента, количество нейтрального липида составляет около 11-20 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет около 43-55 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет около 2,3-2,7 моль % от липидного компонента. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 25-34 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет около 10-20 моль % от липидного компонента; количество вспомогательного липида составляет около 45-65 моль % от липидного компонента; количество PEG-липидов составляет около 2,5-3,5 моль % от липидного компонента. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 30-43 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет около 10-17 моль % от липидного компонента; количество вспомогательного липида составляет около 43,5-56 моль % от липидного компонента; количество PEG-липидов составляет около 1,5-3 моль % от липидного компонента. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 33 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет около 15 моль % от липидного компонента; количество вспомогательного липида составляет около 49 моль % от липидного компонента; количество PEG-липидов составляет около 3 моль % от липидного компонента. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 32,9 моль % от липидного компонента, количество нейтрального липида составляет около 15,2 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет около 49,2 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет около 2,7 моль % от липидного компонента. В определенных вариантах осуществления настоящего

изобретения количество ионизируемого липида составляет около 35 моль % от липидного компонента, количество нейтрального липида составляет около 15 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет около 47,5 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет около 2,5 моль % от липидного компонента.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 20-50 моль %, около 25-34 моль %, около 25-38 моль %, около 25-45 моль %, около 29-38 моль %, около 29-43 моль %, около 29-34 моль %, около 30-34 моль %, около 30-38 моль %, около 30-43 моль %, около 30-43 моль % или около 33 моль %. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения количество ионизируемого липида составляет около 25-45 моль %, около 25-43 моль %, около 25-40 моль %, около 25-38 моль %, около 25-35 моль %, около 25-33 моль %, около 25-30 моль %, около 25-28 моль %, около 28-45 моль %, около 28-43 моль %, около 28-40 моль %, около 28-38 моль %, около 28-35 моль %, около 28-33 моль %, около 28-30 моль %, около 30-45 моль %, около 30-43 моль %, около 30-40 моль %, около 30-38 моль %, около 30-35 моль %, около 30-33 моль %, около 32-45 моль %, около 32-43 моль %, около 32-40 моль %, около 32-38 моль %, около 32-35 моль %, около 35-45 моль %, около 35-43 моль %, около 35-40 моль %, около 35-38 моль %, около 37-45 моль %, около 37-43 моль %, около 37-40 моль %, около 40-45 моль %, около 40-43 моль %, или около 42-45 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % ионизируемого липида может составлять около 30 моль %, около 31 моль %, около 32 моль %, около 33 моль %, около 34 моль %, около 35 моль %, около 36 моль %, около 37 моль %, около 38 моль %, около 39 моль %, около 40 моль %, около 41 моль %, около 42 моль %, около 43 моль %, около 44 моль %, или около 45 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % ионизируемого липида по отношению к липидному компоненту может 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 настоящего изобретения моль % ионизируемого липида по отношению к липидному компоненту может составлять ± 4 моль %, ± 3 моль %, ± 2 моль %, $\pm 1,5$ моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,5$ моль % или $\pm 0,25$ моль % от заданного, номинального или фактического моль %. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения межлотовая вариабельность моль % ионизируемого липида в LNP может составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество моль % основано на номинальной концентрации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество моль % основано на фактической концентрации.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество нейтрального липида составляет около 10-30 моль %, около 11-30 моль %, около 11-20 моль %, около 13-17 моль % или около 15 моль %. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения количество нейтрального липида может

составлять около 5-30 моль %, около 5-28 моль %, около 5-25 моль %, около 5-23 моль %, около 5-20 моль %, около 5-18 моль %, около 5-23 моль %, около 5-20 моль %, около 5-18 моль %, около 5-15 моль %, около 5-13 моль %, около 5-10 моль %, около 10-30 моль %, около 10-28 моль %, около 10-25 моль %, около 10-23 моль %, около 10-20 моль %, около 10-18 моль %, около 10-23 моль %, около 10-20 моль %, около 10-18 моль %, около 10-15 моль %, около 10-13 моль %, около 12-30 моль %, около 12-28 моль %, около 12-25 моль %, около 12-23 моль %, около 12-20 моль %, около 12-18 моль %, около 12-23 моль %, около 12-20 моль %, около 12-18 моль %, около 12-15 моль %, около 15-30 моль %, около 15-28 моль %, около 15-25 моль %, около 15-23 моль %, около 15-20 моль %, около 15-18 моль %, около 15-23 моль %, около 15-20 моль %, около 15-18 моль %, около 17-30 моль %, около 17-28 моль %, около 17-25 моль %, около 17-23 моль %, около 17-20 моль %, около 17-18 моль %, около 17-23 моль %, около 17-20 моль %, около 20-30 моль %, около 20-28 моль %, около 20-25 моль %, около 20-23 моль %, около 22-30 моль %, около 22-28 моль %, около 22-25 моль %, около 22-23 моль %, около 22-20 моль % или около 22-18 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % нейтрального липида может составлять около 10 моль %, около 11 моль %, около 12 моль %, около 13 моль %, около 14 моль %, около 15 моль %, около 16 моль %, около 17 моль %, около 18 моль %, около 19 моль %, около 20 моль %, около 21 моль %, около 22 моль %, около 23 моль %, около 24 моль %, или около 25 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % нейтрального липида по отношению к липидному компоненту может составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от заданного, номинального или фактического моль % нейтральных липидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % нейтрального липида по отношению к липидному компоненту может составлять ± 4 моль %, ± 3 моль %, ± 2 моль %, $\pm 1,5$ моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,5$ моль % или $\pm 0,25$ моль % от заданного, номинального или фактического моль %. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения межлотовая вариабельность LNP будет составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество моль % основано на номинальной концентрации. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество моль % основано на фактической концентрации.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество вспомогательного липида составляет около 35-50 моль %, около 35-65 моль %, около 35-55 моль %, около 38-50 моль %, около 38-55 моль %, около 38-65 моль %, около 40-50 моль %, около 40-65 моль %, около 43-65 моль %, около 43-55 моль % или около 49 моль %. В дополнительных вариантах осуществления изобретения количество вспомогательного липида может составлять около 25-65 моль %, около 28-65 моль %, около 30-65 моль %, около 32-65 моль %, около 35-65 моль %, около 38-65 моль %, около 40-65 моль %, около 42-65 моль %, около 45-65 моль %, около 48-65 моль %, около 50-65 моль %, около 52-65 моль %, около 55-65 моль %, около 58-65 моль %, около 60-65 моль %, около 25-62 моль %, около 28-62 моль %, около 30-62 моль %, около 32-62 моль %, около 35-62 моль %, около 38-62 моль %, около 40-62 моль %, около 42-62 моль %, около 45-62 моль %, около 48-62 моль %, около 50-62 моль %, около 52-62 моль %, около 55-62 моль %, около 58-62 моль %, около 60-62 моль %.

около 35-62 моль %, около 38-62 моль %, около 40-62 моль %, около 42-62 моль %, около 45-62 моль %, около 48-62 моль %, около 50-62 моль %, около 52-62 моль %, около 55-62 моль %, около 58-62 моль %, около 60-62 моль %, около 25-60 моль %, около 28-60 моль %, около 30-60 моль %, около 32-60 моль %, около 35-60 моль %, около 38-60 моль %, около 40-60 моль %, около 42-60 моль %, около 45-60 моль %, около 48-60 моль %, около 50-60 моль %, около 52-60 моль %, около 55-60 моль %, около 58-60 моль %, около 25-58 моль %, около 28-58 моль %, около 30-58 моль %, около 32-58 моль %, около 35-58 моль %, около 38-58 моль %, около 40-58 моль %, около 42-58 моль %, около 45-58 моль %, около 48-58 моль %, около 50-58 моль %, около 52-58 моль %, около 55-58 моль %, около 25-55 моль %, около 28-55 моль %, около 30-55 моль %, около 32-55 моль %, около 35-55 моль %, около 38-55 моль %, около 40-55 моль %, около 42-55 моль %, около 45-55 моль %, около 48-55 моль %, около 50-55 моль %, около 52-55 моль %, около 25-53 моль %, около 28-53 моль %, около 30-53 моль %, около 32-53 моль %, около 35-53 моль %, около 38-53 моль %, около 40-53 моль %, около 42-53 моль %, около 45-53 моль %, около 48-53 моль %, около 50-53 моль %, около 25-50 моль %, около 28-50 моль %, около 30-50 моль %, около 32-50 моль %, около 35-50 моль %, около 38-50 моль %, около 40-50 моль %, около 42-50 моль %, около 45-50 моль %, около 48-50 моль %, около 25-48 моль %, около 28-48 моль %, около 30-48 моль %, около 32-48 моль %, около 35-48 моль %, около 38-48 моль %, около 40-48 моль %, около 42-48 моль %, около 45-48 моль %, около 25-45 моль %, около 28-45 моль %, около 30-45 моль %, около 32-45 моль %, около 35-45 моль %, около 38-45 моль %, около 40-45 моль %, около 42-45 моль %, около 25-43 моль %, около 28-43 моль %, около 30-43 моль %, около 32-43 моль %, около 35-43 моль %, около 38-43 моль %, около 40-43 моль %, около 25-40 моль %, около 28-40 моль %, около 30-40 моль %, около 32-40 моль %, около 35-40 моль %, около 38-40 моль %, около 25-38 моль %, около 28-38 моль %, около 30-38 моль %, около 32-38 моль %, около 35-38 моль %, около 25-35 моль %, около 28-35 моль %, около 30-35 моль %, около 32-35 моль %, около 25-33 моль %, около 28-33 моль %, около 30-33 моль %, около 25-30 моль %, около 28-30 моль %, или около 25-28 моль %. В определенных вариантах осуществления изобретения количество вспомогательного липида корректируется на основе количества ионизируемого липида, нейтрального липида и/или PEG-липидов, чтобы довести количество липидного компонента до примерно 100 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % вспомогательных липидов по отношению к липидному компоненту может составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от заданного, номинального или фактического моль % вспомогательных липидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % вспомогательного липида по отношению к липидному компоненту может составлять ± 4 моль %, ± 3 моль %, ± 2 моль %, $\pm 1,5$ моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,5$ моль % или $\pm 0,25$ моль % от заданного, номинального или фактического моль %. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения межлотовая вариабельность LNP будет составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество

моль % основано на номинальной концентрации. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество моль % основано на фактической концентрации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество PEG-липида составляет около 1,5-3,5 моль %, около 2,0-2,7 моль %, около 2,0-3,5 моль %, около 2,3-3,5 моль %, около 2,3-2,7 моль %, около 2,5-3,5 моль %, около 2,5-2,7 моль %, около 2,9-3,5 моль %, или около 2,7 моль %. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения количество PEG-липида может составлять около 1,0-4,0 моль %, около 1,2-4,0 моль %, около 1,4-4,0 моль %, около 1,5-4,0 моль %, около 1,6-4,0 моль %, около 1,7-4,0 моль %, около 1,8-4,0 моль %, около 1,9-4,0 моль %, около 2,0-4,0 моль %, около 2,1-4,0 моль %, около 2,2-4,0 моль %, около 2,3-4,0 моль %, около 2,4-4,0 моль %, около 2,5-4,0 моль %, около 2,6-4,0 моль %, около 2,7-4,0 моль %, около 2,8-4,0 моль %, около 2,9-4,0 моль %, около 3,0-4,0 моль %, около 3,1-4,0 моль %, около 3,2-4,0 моль %, около 3,3-4,0 моль %, около 3,4-4,0 моль %, около 3,5-4,0 моль %, около 3,7-4,0 моль %, 1,0-3,7 моль %, около 1,2-3,7 моль %, около 1,4-3,7 моль %, около 1,5-3,7 моль %, около 1,6-3,7 моль %, около 1,7-3,7 моль %, около 1,8-3,7 моль %, около 1,9-3,7 моль %, около 2,0-3,7 моль %, около 2,1-3,7 моль %, около 2,2-3,7 моль %, около 2,3-3,7 моль %, около 2,4-3,7 моль %, около 2,5-3,7 моль %, около 2,6-3,7 моль %, около 2,7-3,7 моль %, около 2,8-3,7 моль %, около 2,9-3,7 моль %, около 3,0-3,7 моль %, около 3,1-3,7 моль %, около 3,2-3,7 моль %, около 3,3-3,7 моль %, около 3,4-3,7 моль %, около 3,5-3,7 моль %, 1,0-3,5 моль %, около 1,2-3,5 моль %, около 1,4-3,5 моль %, около 1,5-3,5 моль %, около 1,6-3,5 моль %, около 1,7-3,5 моль %, около 1,8-3,5 моль %, около 1,9-3,5 моль %, около 2,0-3,5 моль %, около 2,1-3,5 моль %, около 2,2-3,5 моль %, около 2,3-3,5 моль %, около 2,4-3,5 моль %, около 2,5-3,5 моль %, около 2,6-3,5 моль %, около 2,7-3,5 моль %, около 2,8-3,5 моль %, около 2,9-3,5 моль %, около 3,0-3,5 моль %, около 3,1-3,5 моль %, около 3,2-3,5 моль %, около 3,3-3,5 моль %, около 3,4-3,5 моль %, 1,0-3,4 моль %, около 1,2-3,4 моль %, около 1,4-3,4 моль %, около 1,5-3,4 моль %, около 1,6-3,4 моль %, около 1,7-3,4 моль %, около 1,8-3,4 моль %, около 1,9-3,4 моль %, около 2,0-3,4 моль %, около 2,1-3,4 моль %, около 2,2-3,4 моль %, около 2,3-3,4 моль %, около 2,4-3,4 моль %, около 2,5-3,4 моль %, около 2,6-3,4 моль %, около 2,7-3,4 моль %, около 2,8-3,4 моль %, около 2,9-3,4 моль %, около 3,0-3,4 моль %, около 3,1-3,4 моль %, около 3,2-3,4 моль %, около 3,3-3,4 моль %, 1,0-3,3 моль %, около 1,2-3,3 моль %, около 1,4-3,3 моль %, около 1,5-3,3 моль %, около 1,6-3,3 моль %, около 1,7-3,3 моль %, около 1,8-3,3 моль %, около 1,9-3,3 моль %, около 2,0-3,3 моль %, около 2,1-3,3 моль %, около 2,2-3,3 моль %, около 2,3-3,3 моль %, около 2,4-3,3 моль %, около 2,5-3,3 моль %, около 2,6-3,3 моль %, около 2,7-3,3 моль %, около 2,8-3,3 моль %, около 2,9-3,3 моль %, около 3,0-3,3 моль %, около 3,1-3,3 моль %, около 3,2-3,3 моль %, 1,0-3,2 моль %, около 1,2-3,2 моль %, около 1,4-3,2 моль %, около 1,5-3,2 моль %, около 1,6-3,2 моль %, около 1,7-3,2 моль %, около 1,8-3,2 моль %, около 1,9-3,2 моль %, около 2,0-3,2 моль %, около 2,1-3,2 моль %, около 2,2-3,2 моль %, около 2,3-3,2 моль %, около 2,4-3,2 моль %, около 2,5-3,2 моль %, около 2,6-3,2 моль %, около 2,7-3,2 моль %, около 2,8-3,2 моль %, около 2,9-3,2 моль %, около 3,0-3,2 моль %, около 3,1-3,2

моль %, около 1,9-2,0 моль %, 1,0-1,9 моль %, около 1,2-1,9 моль %, около 1,4-1,9 моль %, около 1,5-1,9 моль %, около 1,6-1,9 моль %, около 1,7-1,9 моль %, около 1,8-1,9 моль %, 1,0-1,8 моль %, около 1,2-1,8 моль %, около 1,4-1,8 моль %, около 1,5-1,8 моль %, около 1,6-1,8 моль %, около 1,7-1,8 моль %, 1,0-1,7 моль %, около 1,2-1,7 моль %, около 1,4-1,7 моль %, около 1,5-1,7 моль %, около 1,6-1,7 моль %, 1,0-1,6 моль %, около 1,2-1,6 моль %, около 1,4-1,6 моль %, около 1,5-1,6 моль %, 1,0-1,5 моль %, около 1,2-1,5 моль %, около 1,4-1,5 моль %, около 1,5-1,5 моль %, около 1,6-1,5 моль %, около 1,7-1,5 моль %, около 1,8-1,5 моль %, около 1,9-1,5 моль %, 1,0-1,4 моль %, около 1,2-1,4 моль %, от 1,0-1,2 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % PEG-липидов может составлять около 1,5 моль %, около 1,6 моль %, около 1,7 моль %, около 1,8 моль %, около 1,9 моль %, около 2,0 моль %, около 2,1 моль %, около 2,2 моль %, около 2,3 моль %, 2,4 моль %, 2,5 моль %, 2,6 моль %, 2,7 моль %, 2,8 моль %, 2,9 моль %, 3,0 моль %, 3,1 моль %, 3,2 моль %, 3,3 моль %, 3,4 моль % или 3,5 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моль % PEG-липидов по отношению к липидному компоненту может составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от указанного, номинального или фактического моль % PEG-липидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения моль % PEG-липидов по отношению к липидному компоненту может составлять ± 4 моль %, ± 3 моль %, ± 2 моль %, $\pm 1,5$ моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,5$ моль % или $\pm 0,25$ моль % от заданного, номинального или фактического моль %. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения межклеточная вариативность LNP будет составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество моль % основано на номинальной концентрации. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество моль % основано на фактической концентрации.

В определенных вариантах осуществления изобретения количество вспомогательного липида составляет около 30-40 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 2,5-3,5 моль %; количество вспомогательного липида составляет около 33-37 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 2,9-3,3 моль %; или количество вспомогательного липида составляет около 35 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 3 моль %. В определенных вариантах осуществления изобретения количество вспомогательного липида составляет около 37-47 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 2,0-3,0 моль %; количество вспомогательного липида составляет около 40-45 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 2,2-2,8 моль %; или количество вспомогательного липида составляет около 42 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 2,2-2,8 моль %. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество вспомогательного липида составляет около 47-57 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 2,0-3,0 моль %; количество вспомогательного липида составляет около 50-55 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 2,3-2,7 моль %; или количество вспомогательного липида составляет около 52 моль %, а количество PEG-липидов составляет около 2,3-2,7 моль %.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения липидные композиции, такие как композиции LNP, содержат липидный компонент и компонент, являющийся нуклеиновой кислотой (также называемый водным компонентом), например, РНК-компонент, и можно измерить молярное соотношение соединения Формулы (I) или (II) к нуклеиновой кислоте. В вариантах осуществления настоящего изобретения также представлены липидные композиции с определенным молярным отношением между положительно заряженными аминными группами фармацевтически приемлемых солей соединений Формулы (I) или (II) (N) и отрицательно заряженными фосфатными группами (P) нуклеиновой кислоты для инкапсулирования. Математически это может быть представлено соотношением N/P. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция, такая как композиция LNP, может содержать липидный компонент, который включает соединение Формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль; и компонент, являющийся нуклеиновой кислотой, при этом соотношение N/P составляет от около 3 до 10. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция LNP может содержать липидный компонент, который включает соединение Формулы (I) или (II), или его фармацевтически приемлемую соль, и РНК-компонент, при этом соотношение N/P составляет от около 3 до 10. Например, соотношение N/P может составлять около 4-7, около 5-7 или от 6 до 7. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соотношение N/P может составлять около 6, например, 6 ± 1 или $6 \pm 0,5$. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соотношение N/P может составлять около 7, например, 7 ± 1 или $7 \pm 0,5$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент содержит биологически активный агент. В некоторых вариантах настоящего изобретения водный компонент содержит полипептид, необязательно в комбинации с нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент содержит нуклеиновую кислоту, такую как РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент представляет собой компонент, являющийся нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, компонент, являющийся нуклеиновой кислотой, содержит ДНК и его можно назвать ДНК-компонентом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения компонент, являющийся нуклеиновой кислотой, содержит РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент, такой как компонент РНК, может содержать мРНК, например, мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу Cas. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент может содержать мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как Cas9. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения биологически активный агент представляет собой мРНК нуклеазы Cas. В определенных вариантах осуществления

настоящего изобретения биологически активный агент представляет собой mРНК нуклеазы Cas класса 2. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения биологически активный агент представляет собой mРНК нуклеазы Cas9. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент может содержать модифицированную РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент может содержать нуклеиновую кислоту гидовой РНК. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент может содержать gРНК. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент может содержать dgРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент может содержать модифицированную gРНК. В некоторых композициях, содержащих mРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, композиция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту gРНК, например, gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент содержит mРНК нуклеазы Cas и gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения водный компонент содержит mРНК нуклеазы Cas класса 2 и gРНК.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция, например, композиция LNP, может содержать mРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas класса 2, соединение Формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль, вспомогательный липид, необязательно нейтральный липид и PEG-липид. В определенных композициях, содержащих mРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas класса 2, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В других композициях, содержащих mРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas класса 2, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, содержащих mРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas класса 2, например, Cas9, PEG-липид представляет собой PEG2k-DMG. В конкретных композициях, содержащих mРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas класса 2, и соединение Формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль. В определенных композициях, композиция дополнительно содержит gРНК, такую как dgРНК или sgРНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция, такая как композиция LNP, может содержать gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать соединение Формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль, gРНК, вспомогательный липид, необязательно нейтральный липид и PEG-липид. В некоторых композициях LNP, содержащих gРНК, вспомогательным липидом является холестерин. В некоторых композициях, содержащих gРНК, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, содержащих gРНК,

PEG-липид представляет собой PEG2k-DMG. В определенных композициях, gРНК выбрана из dgРНК и sgРНК.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция, такая как композиция LNP, содержит mРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и gРНК, которая может быть sgРНК в водном компоненте, и соединение Формулы (I) или (II) в липидном компоненте. Например, композиция LNP может содержать соединение Формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль, mРНК, кодирующую нуклеазу Cas, gРНК, вспомогательный липид, нейтральный липид и PEG-липид. В определенных композициях, содержащих mРНК, кодирующую нуклеазу Cas и gРНК, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В некоторых композициях, содержащих mРНК, кодирующую нуклеазу Cas и gРНК, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, включающих mРНК, кодирующую нуклеазу Cas, и gРНК, PEG-липид представляет собой PEG2k-DMG.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения липидные композиции, например, композиции LNP, включают РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как mРНК Cas класса 2, и по меньшей мере одну gРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК представляет собой sgРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой mРНК Cas9. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция LNP имеет соотношение gРНК и mРНК РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как mРНК нуклеазы Cas класса 2, около 1:1 или около 1:2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 около 1:4 по массе или от около 1:1 до около 1:2.

Липидные композиции, описанные в данном документе, такие как композиции LNP, могут быть применены в способах, описанных в данном документе, для доставки компонентов CRISPR/Cas9 для вставки матричной нуклеиновой кислоты, например, матричной ДНК. Матричная нуклеиновая кислота может быть доставлена вместе или отдельно с липидными композициями, содержащими соединение Формулы (I) или (II) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения матричная нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной, в зависимости от необходимого механизма восстановления. Матрица может иметь области гомологии с целевой ДНК, например, в пределах последовательности целевой ДНК, и/или с последовательностями, смежными с целевой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения буфер применяется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, на уровне pH 6,5 или выше. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения буфер применяется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, на уровне pH 7,0 или выше. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция имеет pH в диапазоне от около 7,2 до около 7,7. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция имеет pH в диапазоне от около 7,3 до около 7,7 или в диапазоне от около 7,4 до около 7,6. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция имеет pH около 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 или 7,7. pH композиции может быть измерен с помощью микродетектора pH. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения в композицию включают криопротектор. Неограничивающие примеры криопротекторов включают сахарозу, трегалозу, глицерин, DMSO и этиленгликоль. Типовые композиции могут содержать до 10% криопротектора, такого как, например, сахароза. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать трис-солевой раствор сахарозы (TSS). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция LNP может содержать около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% криопротектора. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция LNP может содержать около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% сахарозы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция LNP может содержать буфер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буфер может содержать фосфатный буфер (PBS), Трис-буфер, цитратный буфер и их смеси. В определенных типовых вариантах осуществления настоящего изобретения буфер содержит NaCl. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения буфер не содержит NaCl. Типовые количества NaCl могут варьироваться от около 20 mM до около 45 mM. Типовые количества NaCl могут варьироваться от около 40 mM до около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления количество NaCl составляет около 45 mM. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буфер представляет собой Трис-буфер. Типовые количества Трис могут варьироваться от около 20 mM до около 60 mM. Типовые количества Трис могут варьироваться от около 40 mM до около 60 mM. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество Трис составляет около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения буфер содержит NaCl и Трис. В определенных типовых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP содержат 5% сахарозы и 45 mM NaCl в Трис-буфере. В других типовых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции содержат сахарозу в количестве около 5% мас./об., около 45 mM NaCl и около 50 mM Трис при pH

7,5. Количества соли, буфера и криопротектора могут варьироваться таким образом, чтобы поддерживать осмолярность всей композиции. Например, конечная осмолярность может поддерживаться на уровне менее 450 мОсм/л. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения осмолярность составляет от 350 до 250 мОсм/л. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения конечная осмолярность составляет 300 +/- 20 мОсм/л или 310 +/- 40 мОсм/л.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяется микрофлюидное смешивание, Т-смешивание или перекрестное смешивание водного раствора РНК и раствора липида в органическом растворителе. 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 настоящего изобретения композицию LNP хранят при температуре 2-8 °С, в определенных аспектах композиции LNP хранят при комнатной температуре. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения композицию LNP хранят в замороженном виде, например, при -20°С или -80 °С. В других вариантах осуществления настоящего изобретения композицию LNP хранят при температуре в диапазоне от около 0°С до около -80 °С. Замороженные композиции LNP можно размораживать перед применением, например, на льду, при комнатной температуре или при 25 °С.

Предпочтительные липидные композиции, такие как композиции LNP, являются биоразлагаемыми, например, поскольку они не накапливаются до цитотоксических уровней *in vivo* при терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции не вызывают врожденного иммунного ответа, приводящего к существенным нежелательным эффектам при терапевтическом уровне дозы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции, предложенные в данном документе, не вызывают токсичности при уровне терапевтической дозы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения для определения индекса полидисперсности (PDI) и размера LNP по настоящему изобретению может быть применен метод с динамическим рассеиванием света («DLS»). Метод DLS измеряет рассеивание света, возникающее при воздействии на образец источником 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 настоящего изобретения описанные в данном документе LNP имеют PDI от около 0,005 до около 0,75. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные в данном документе LNP имеют PDI от около 0,005 до около 0,1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения LNP имеют PDI, от около 0,01 до около 0,5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют PDI, от около нуля до около 0,4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют PDI, от около нуля до около 0,35. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения PDI LNP может варьироваться от около нуля до около 0,3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют PDI, который 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 настоящего изобретения LNP имеют PDI, от около нуля до около 0,05. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют PDI, от около нуля до около 0,01. В некоторых вариантах осуществления изобретения 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 настоящего изобретения размер LNP может быть измерен с помощью системы асимметричного проточного фракционирования частиц в поперечном гравитационном поле - многоугольного рассеяния света (AF4-MALS). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения размер и концентрация частиц LNP могут быть измерены с помощью анализа отслеживания движения наночастиц (NTA, Malvern Nanosight). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения размер, морфология и

структурные характеристики LNP могут быть определены с помощью криоэлектронной микроскопии («крио-ЭМ»).

LNP композиций LNP, описанных в данном документе, имеют размер (*например*, Z-средний диаметр или среднечисловой диаметр) от около 1 до около 250 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 10 до около 200 нм. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 20 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 50 до около 150 нм или около 70 до 130 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 50 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 50 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 60 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 75 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 75 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер от около 75 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP имеют размер 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 настоящего изобретения LNP имеют размер менее около 145 нм, менее около 120 нм, менее около 115 нм, менее около 100 нм или менее около 80 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения размер LNP составляет более около 50 нм или более около 60 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения размер частиц представляет собой Z-средний размер частиц. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения размер частицы представляет собой среднечисловое значение. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения размер частиц представляет собой размер отдельной LNP. Если не указано иное, все размеры, упоминаемые в данном документе, представляют собой средние размеры (диаметры) полностью сформированных наночастиц, измеренные методом динамического рассеяния света на приборе Malvern Zetasizer или Wyatt NanoStar. Образец наночастиц разбавляют в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) так, чтобы скорость счета составляла примерно 200-400 кпс.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 50% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 50% до около 95%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 70% до около 90%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP

формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 90% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 75% до около 95%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 90% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 95% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 98% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP формируют со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 99% до около 100%.

Груз

Груз, доставляемый с помощью описанной в данном документе композиции LNP, включает биологически активный агент. Биологически активный агент может представлять собой нуклеиновую кислоту, например, мРНК или гРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения груз представляет собой или содержит один или большее количество биологически активных агентов, таких как мРНК, гРНК, вектор экспрессии, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, антитело (например, моноклональное, химерное, гуманизированное, нанотело и его фрагменты и др.), холестерин, гормон, пептид, белок, химиотерапевтический и другие виды антинеопластических агентов, низкомолекулярный препарат, витамин, кофактор, нуклеозид, нуклеотид, олигонуклеотид, ферментная нуклеиновая кислота, антисмысловая нуклеиновая кислота, триплексообразующий олигонуклеотид, антисмысловая ДНК- или РНК-композиция, химерная ДНК:РНК-композиция, аллозим, аптамер, рибозим, приманки и их аналоги, плазмид и другие типы векторов, а также малая молекула нуклеиновой кислоты, РНКi-агент, молекулы короткой интерферирующей нуклеиновой кислоты (siNA), короткой интерферирующей РНК (siРНК), двухцепочечной РНК (dsРНК), микро-РНК (miРНК), короткой шпилечной РНК (shРНК) и «самореплицирующейся РНК» (кодирующая активность фермента репликазы и способная направлять собственную репликацию или амплификацию *in vivo*), пептидная нуклеиновая кислота (PNA), заблокированный рибонуклеотид нуклеиновой кислоты (LNA), морфолинонуклеотид, треозиновая нуклеиновая кислота (TNA), гликолевая нуклеиновая кислота (GNA), sisiРНК (малая внутренне сегментированная интерферирующая РНК) и iРНК (асимметричная интерферирующая РНК). Приведенный выше перечень биологически активных агентов является примерным и не претендует на ограничение. Такие соединения могут быть очищенными или частично очищенными, природного происхождения или синтетическими, а также химически модифицированными.

Груз, доставляемый с помощью композиции LNP, может представлять собой РНК, например, молекулу мРНК, кодирующую интересующий нас белок. Например, мРНК для

экспрессии белка, такого как зеленый флуоресцентный белок (GFP), РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или Cas-нуклеаза. Предлагаются композиции LNP, включающие мРНК Cas-нуклеазы, например, мРНК Cas-нуклеазы класса 2, которая позволяет экспрессировать в клетке Cas-нуклеазу класса 2, такую как белок Cas9 или Cpf1 (также называемый Cas12a). Кроме того, груз может содержать одну или большее количество гРНК или нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК. Матричная нуклеиновая кислота, *например*, для репарации или рекомбинации, также может быть включена в состав композиций или матричная нуклеиновая кислота может быть применена в способах, описанных в данном документе. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения груз содержит мРНК, кодирующую Cas9 *Streptococcus pyogenes*, Cas9и, необязательно, гРНК *S. pyogenes*. В другом из вариантов осуществления настоящего изобретения груз содержит мРНК, кодирующую Cas9 *Neisseria meningitidis*, и необязательно гРНК Nme (*Neisseria meningitidis*).

«мРНК» относится к полинуклеотидам и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (*т.е.* служить субстратом для трансляции рибосомой и аминокислотами тРНК). мРНК может содержать фосфатно-сахарную основу, включающую остатки рибозы или их аналоги, *например*, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сахара фосфатно-сахарной основы 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.

Инструменты редактирования генома

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция LNP представляет собой сборку липидных нуклеиновых кислот, называемую также композицией липидных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция липидных нуклеиновых кислот или композиция LNP включает инструмент редактирования генома или кодирующую его нуклеиновую кислоту. В данном документе под термином «инструмент редактирования генома» (или «инструмент редактирования генов») понимается любой компонент системы редактирования генома (или «системы редактирования генов»), необходимый или пригодный для внесения изменений в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы доставки в клетку (или популяцию клеток) инструментов системы редактирования генома (*например*, система нуклеаз «цинковые пальцы», система TALEN, система мегануклеаз или система CRISPR/Cas). К инструментам редактирования генома относятся, *например*, нуклеазы, способные осуществлять одно- или двуцепочечные разрывы в ДНК или РНК клетки, *например*, в геноме клетки. Инструменты для редактирования генома, *например*,

нуклеазы, могут необязательно модифицировать геном клетки без расщепления нуклеиновой кислоты, или никазы. Нуклеаза или никаза для редактирования генома может кодироваться с помощью мРНК. К таким нуклеазам относятся, например, РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты и компоненты CRISPR/Cas. Инструменты для редактирования генома включают слитые белки, в том числе, например, никаза, слитая с эффекторным доменом, таким как редакторный домен. К инструментам редактирования генома относятся любые элементы, необходимые или пригодные для достижения цели редактирования генома, такие как, например, гидовая РНК, sgРНК, dgРНК, донорная нуклеиновая кислота и тому подобное.

В данном документе описаны различные подходящие системы редактирования генома, включающие инструменты для редактирования генома, которые могут поставляться вместе с композициями для сборки липидных нуклеиновых кислот, включая, помимо прочего, систему CRISPR/Cas, систему нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN) и систему эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN). Как правило, системы редактирования генов включают применение сконструированных систем индуцирующих двухцепочечный разрыв (DSB) или разрез (например, одноцепочечный разрыв или SSB) в целевой последовательности ДНК. Расщепление или разрез может осуществляться с помощью специфических нуклеаз, таких как сконструированные ZFN, TALEN, или с помощью системы CRISPR/Cas со сконструированной гидовой РНК для управления специфическим расщеплением или разрезом целевой последовательности ДНК. Кроме того, на основе системы Argonaute разрабатываются нацеленные 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 геномной терапии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные композиции содержат один или большее количество агентов, модифицирующих ДНК, таких как 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 изобретения белки, связывающиеся с определенной последовательностью ДНК или набором последовательностей, могут быть применены для индуцирования модификации ДНК, такой как разрыв цепи. Белки могут быть модифицированы различными способами, например, с помощью встраивания ^{125}I , радиоактивный распад которого приводит к разрыву цепи, или с помощью модифицирующих сшивающих реагентов, таких как 4-азидофенацилбромид, образующих 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 изобретения описанные композиции содержат один или большее количество агентов для разрезания ДНК. К агентам для разрезания ДНК относятся такие технологии, как нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные 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 целевых 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 настоящего изобретения 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 цепи 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 редактировании генома 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, публикации WO 2019147805, WO 2014040370, WO 2018073393, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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. В качестве домена расщепления в ZFN обычно используется домен неспецифического расщепления из эндонуклеазы рестрикции типа *Is* FokI. 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, публикацию WO 2011091324, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во

всей своей полноте.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения описанные композиции содержат мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, Cas-нуклеазу. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения описанные композиции содержат мРНК, кодирующую нуклеазу Cas класса 2, такую как Cas9 *S. pyogenes*.

В контексте данного документа «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих РНК- и ДНК-связывающей активностью, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, причем ДНК-связывающая активность является специфической для последовательности и зависит от последовательности РНК. Типовые РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают клевазы/никазы Cas и их инактивированные формы («ДНК-связывающие агенты dCas»). Термин «нуклеаза Cas», в контексте данного документа, охватывает клевазы Cas, никазы Cas и ДНК-связывающие агенты dCas. Клевазы/никазы Cas и ДНК-связывающие агенты 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. В контексте данного документа «нуклеаза Cas класса 2» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Нуклеазы Cas класса 2 включают клевазы/никазы Cas класса 2 (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно имеют РНК направляемую клевазную или никазную активность по отношению к ДНК-, и dCas ДНК-связывающие агенты класса 2, в которых клевазная или никазная активность 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 в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. См., например, Zetsche, Tables 2 and 4. See, e.g., Makarova et al., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

Неограничивающие типовые 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*, *Nocardiosis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *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 beccsii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Fingoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochrodatum 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.*, *Petrogona 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 настоящего изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. В других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus thermophilus*. В еще других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения 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 настоящего изобретения нуклеаза Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas9 представляет собой Cas9 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas9 способна индуцировать разрыв двухцепочечной цепи в целевой ДНК. В других вариантах

осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas может расщеплять dsДНК, она может расщеплять одну цепь dsДНК или может не обладать клевазной или никазной активностью в отношении ДНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяются химерные нуклеазы Cas, в которых один домен или область белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен нуклеазы Cas может быть заменен доменом из другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas может представлять собой модифицированную нуклеазу.

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

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает одноцепочечной никазной активностью, *то есть* может разрезать одну цепь ДНК с образованием разрыва одной цепи, также известного как «разрез». В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит никазу Cas. Никаза представляет собой фермент, который создает разрез в dsДНК, *т.е.* перерезает одну цепь, но не перерезает другую часть двойной спирали ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения никаза Cas представляет собой вариант нуклеазы Cas (*например*, рассмотренной выше), в которой эндонуклеолитический активный сайт инактивирован, *например*, путем одного или нескольких изменений (*например*, точечных мутаций) в каталитическом домене. См., *например*, патент США № 8889356 для получения информации о Cas никазах и типовых изменениях каталитических доменов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения никаза Cas, такая как никаза Cas9, имеет инактивированный домен RuvC или HNH. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент 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 расщеплению в отношении нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяют никазу, имеющую домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяют никазу, имеющую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяют никазу,

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

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения консервативную аминокислоту в домене белка нуклеазы Cas замещают для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения 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 настоящего изобретения мРНК, кодирующая никазу, предложена в комбинации с парой гидовых РНК, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В данном варианте осуществления настоящего изобретения гидовые РНК направляют никазу на целевую последовательность и вводят DSB путем образования разрезов на противоположных цепях целевой последовательности (*m.e.*, двойной разрез). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применение двойного одноцепочечного разреза может улучшать специфичность и уменьшать нецелевые эффекты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения никаза применяется вместе с двумя отдельными гидовыми РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного разреза в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными гидовыми РНК, которые выбраны так, чтобы они находились в непосредственной близости, для создания двойного одноцепочечного разреза в целевой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент не обладает клявальной и никазной активностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, при этом по существу не обладает каталитической (клявальной/никазной) активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, не обладающий клявальной 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*, в результате одного или большего количества изменений (*например*, точечных мутаций) в ее каталитических доменах. См., *например*, публикации US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазу APOBEC3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дезаминаза APOBEC3 представляет собой APOBEC3A (A3A). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения A3A представляет собой A3A человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения A3A представляет собой A3A дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит редактор. Примером редактора является BC22n, который содержит APOBEC3A *H. sapiens*, слитую с нуклеазой Cas9 *S. pyogenes*-D10A с помощью линкера XTEN. В некоторых вариантах осуществления изобретения редактор представляет собой ингибитор урацил-гликозилазы ("UGI"). В некоторых вариантах осуществления изобретения редактор слит с UGI. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения mРНК, кодирующая редактор, и mРНК, кодирующая UGI, совместно соствлены в LNP. В других вариантах осуществления настоящего изобретения редактор и UGI представлены в отдельных LNP.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит один или большее количество гетерологичных функциональных доменов (*например*, представляет собой или содержит слитый полипептид).

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

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен модифицировать внутриклеточное время полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента может быть увеличен. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента может быть уменьшен. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен повышать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен снижать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный

функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для деградации белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения деградация белка может быть опосредовано протеолитическими ферментами, такими как, например, протеасомы, лизосомальные протеазы или кальпаин-протеазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может содержать PEST-последовательность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть модифицирован путем добавления убиквитина или полиубиквитиновой цепи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой маркерный домен. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают флуоресцентные белки, метки для очистки, эпитопные метки и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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, DsRed-мономер, 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 настоящего изобретения 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 (ВССР), поли-His и кальмодулин. Неограничивающие примеры репортерных генов включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

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

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой эффекторный домен, такой как редакторный домен. Если РНК-направляемый ДНК-связывающий агент направлен на свою целевую последовательность, *например*, когда нуклеаза Cas направляется на целевую последовательность с помощью gРНК, эффекторный домен, *например*, редакторный домен, может модифицировать или влиять на целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффекторный домен, такой как редакторный домен, 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 настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., *например*, патент США № 9,023,649. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой транскрипционный активатор или репрессор. См. *например*, публикации 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). Как таковой, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент по существу становится фактором транскрипции, который может быть направлен на связывание желаемой целевой последовательности с помощью гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен модификации ДНК представляет собой домен метилирования, такой как домен деметилирования или метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффекторный домен представляет собой домен модификации ДНК, такой как домен, редактирующий основания. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения домен модификации ДНК представляет собой домен, редактирующий нуклеиновые кислоты, который вводит специфическую модификацию в ДНК, такой как дезаминазный домен. См., *например*, WO

2015/089406; US 2016/0304846. Домены редактирования нуклеиновых кислот, домены деаминазы и варианты Cas9, описанные в публикациях WO 2015/089406 и U.S. 2016/0304846, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Нуклеаза может содержать по меньшей мере один домен, который взаимодействует с гидовой РНК («gРНК»). Кроме того, нуклеаза может быть направлена на целевую последовательность с помощью gРНК. В системах нуклеаз Cas класса 2 gРНК взаимодействует с нуклеазой, а также с целевой последовательностью, так что она направляет связывание с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК обеспечивает специфичность для целевого расщепления, и нуклеаза может быть универсальной и в паре с разными gРНК расщеплять разные целевые последовательности. Нуклеаза Cas класса 2 может соединяться с каркасной структурой gРНК типов, ортологов и типовых видов, перечисленных выше.

В контексте данного документа «рибонуклеопротеин» (RNP) или «комплекс RNP» относится к gРНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как нуклеаза Cas, например, клеваза Cas, никаза Cas или ДНК-связывающий агент dCas (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9 в целевую последовательность, и gРНК гибридизуется с агентом и связывается с целевой последовательностью; в случаях, если агент представляет собой клевазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или разрез.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения груз для композиции LNP включает по меньшей мере одну gРНК, содержащую гидовую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может представлять собой нуклеазу (например, нуклеазу Cas, такую как Cas9), к целевой ДНК. gРНК может направлять нуклеазу Cas или нуклеазу Cas класса 2 к целевой последовательности в целевой молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК связывается и обеспечивает специфичность расщепления нуклеазой Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК и нуклеаза Cas могут образовывать рибонуклеопротеид (RNP), например, комплекс CRISPR/Cas, в частности, комплекс CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas9 типа II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas типа V, такой как комплекс Cpf1/ gРНК. Нуклеазы Cas и родственные gРНК могут быть спарены. Структуры каркаса gРНК, которые соединяются с каждой нуклеазой Cas класса 2, различаются в зависимости от конкретной системы CRISPR/Cas.

«Гидовая РНК», «gРНК» и просто «направляющая» применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения родственной гидовой нуклеиновой кислоты

для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Гидовые РНК могут включать модифицированные РНК, как описано в данном документе. В качестве gРНК может выступать, например, либо одна гидовая РНК или комбинация crРНК и trРНК (также известная как tracrРНК). crРНК и trРНК могут быть связаны в виде одиночной молекулы РНК (одиночная гидовая РНК, sgРНК) или, например, в виде двух отдельных цепей РНК (двойная гидовая РНК, dgРНК). В некоторых системах gРНК может представлять собой crРНК (также известную как CRISPR РНК). Термин «гидовая РНК» или «gРНК» относится к каждому типу. trРНК может быть природной последовательностью или последовательностью trРНК с модификациями или вариациями по сравнению с природными последовательностями.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения mРНК, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, составлена в первой композиции LNP, а нуклеиновая кислота gРНК составлена во второй композиции LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первую и вторую композиции LNP вводят одновременно. В других вариантах осуществления настоящего изобретения первую и вторую композиции LNP вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первую и вторую композиции LNP объединяют перед этапом преинкубации. В других вариантах осуществления настоящего изобретения первую и вторую композиции LNP преинкубируют отдельно.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения груз может представлять собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую crРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая crРНК, содержит нацеливающую последовательность, фланкированную всей или частью повторяющейся последовательности из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеотидную последовательность, кодирующую tracr РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения crРНК и tracr РНК могут кодироваться двумя отдельными нуклеиновыми кислотами. В других вариантах осуществления настоящего изобретения crРНК и tracr РНК могут кодироваться одной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения crРНК и tracr РНК могут кодироваться противоположными цепями одной нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления настоящего изобретения crРНК и tracr РНК могут кодироваться одной и той же цепью одной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК кодирует sgРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК кодирует sgРНК нуклеазы Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК кодирует sgРНК 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 а 5' UTR. В одном примере промотор может представлять собой промотор tРНК, *например*, tРНКLys3 или химеру tРНК. См. Mefferd et al., *РНК*. 2015 21:1683-9; Scherer et al., *Nucleic Acids Res.* 2007 35: 2620-2628. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения промотор может распознаваться РНК-полимеразой III (Pol III). Неограничивающие примеры промоторов Pol III также включают промоторы U6 и H1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с промотором U6 мыши или человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК представляет собой модифицированную нуклеиновую кислоту. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК содержит модифицированный нуклеозид или нуклеотид. В некоторых вариантах настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК содержит 5'-концевую модификацию, например, модифицированный нуклеозид или нуклеотид для стабилизации и предотвращения интеграции нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК содержит двухцепочечную ДНК, имеющую 5'-концевую модификацию на каждой цепи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК содержит в качестве 5'-концевой модификации инвертированный дидезокси-Т или инвертированный нуклеозид с удаленным азотистым основанием или нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота gРНК содержит метку, такую как биотин, дестиобиотин-TEG, дигоксигенин и флуоресцентные маркеры, включая, например, FAM, ROX, TAMRA и AlexaFluor.

В контексте данного документа «гидовая последовательность» относится к последовательности в gРНК, которая является комплементарной целевой последовательности и функционирует для направления gРНК к целевой последовательности для связывания и/или модификации (*например*, расщепления) посредством РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. «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 настоящего изобретения целевая последовательность находится в гене или на хромосоме, например, и является комплементарной гидовой последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 настоящего изобретения гидовая последовательность и целевая область может 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 настоящего изобретения 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 настоящего изобретения 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 настоящего изобретения гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем гидовая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения несколько композиций LNP могут применяться совместно и/или по отдельности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка может контактировать с первой и второй композициями LNP, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая и вторая композиции LNP независимо друг от друга содержат одну или большее количество мРНК, гРНК и нуклеиновую кислоту гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первую и вторую композиции LNP вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первую и вторую композиции LNP вводят последовательно.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения множественных редакций генома в клетке (иногда упоминаемый в данном документе и других источниках как «мультиплексирование», «мультиплексное редактирование генов» или «мультиплексное редактирование генома»). Возможность конструирования множества признаков в одной клетке зависит от способности эффективно осуществлять редактирование множества целевых генов, включая нокауты и вставки в локусы, сохраняя при этом жизнеспособность и желаемый фенотип клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает культивирование клетки *in vitro*, контакт клетки с двумя или большим количеством композиций для сборки липидных нуклеиновых кислот, причем каждая композиция для сборки липидных нуклеиновых кислот содержит инструмент для редактирования генома нуклеиновой кислоты, способный редактировать целевой сайт, и размножение клетки *in vitro*. В результате применения указанного способа получают клетку, имеющую более одной геномной редакции, причем геномные редакции будут различаться. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения первая композиция LNP содержит первую гРНК, а вторая композиция LNP содержит вторую гРНК, при этом

первая и вторая gРНК содержат разные гидовые последовательности, комплементарные разным мишеням. В таких вариантах осуществления настоящего изобретения с помощью композиций LNP можно осуществлять мультиплексное редактирование генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка контактирует с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 композициями для сборки липидных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка контактирует по меньшей мере с 6 композициями для сборки липидных нуклеиновых кислот.

Целевые последовательности для РНК-направляемых ДНК-связывающих белков, 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 gРНК для связывания с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, 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.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в данном документе, нацелены на ген, который снижает или устраняет экспрессию на поверхности T-клеточного рецептора, МНС класса I или МНС класса II. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в данном документе, нацелены на TRAC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в данном документе, нацелены на TRBC. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в данном документе, нацелены на СПТА. В еще других вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в данном документе, нацелены на HLA-A. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в данном документе, нацелены на HLA-B. В других вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в данном документе, нацелены на HLA-C. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК, описанные в данном документе, нацелены на В2М. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы получения множественных редакций генома в культивируемой *in vitro* клетке, включающие следующие этапы: а) приведение клетки в контакт *in vitro* по меньшей мере с первой липидной композицией, содержащей первую нуклеиновую кислоту, в результате чего образуется контактирующая клетка; б) приведение клетки в контакт *in vitro* по меньшей мере со второй липидной композицией, содержащей вторую нуклеиновую кислоту, при этом вторая нуклеиновая кислота отличается от первой; и в) размножение

клетки *in vitro*. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы получения множественных редакций генома в культивируемой *in vitro* клетке, включающие следующие этапы: а) приведение клетки в контакт *in vitro* по меньшей мере с первой липидной композицией, содержащей первую нуклеиновую кислоту, в результате чего образуется контактирующая клетка; б) культивирование контактирующей клетки *in vitro* с получением культивированной контактирующей клетки; в) приведение в контакт культивированной контактирующей клетки *in vitro* по меньшей мере со второй липидной композицией, содержащей вторую нуклеиновую кислоту, при этом вторая нуклеиновая кислота отличается от первой нуклеиновой кислоты; и г) размножение клетки *in vitro*. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения способы дополнительно включают приведение клетки в контакт *in vitro* по меньшей мере с третьей липидной композицией, содержащей третью нуклеиновую кислоту, при этом третья нуклеиновая кислота отличается от первой и второй нуклеиновых кислот. В других дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения способы дополнительно включают приведение клетки в контакт *in vitro* по меньшей мере с четвертой липидной композицией, содержащей четвертую нуклеиновую кислоту, при этом четвертая нуклеиновая кислота отличается от первой, второй и третьей нуклеиновых кислот. В еще следующих дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения способы дополнительно включают приведение клетки в контакт *in vitro* по меньшей мере с пятой липидной композицией, содержащей пятую нуклеиновую кислоту, при этом пятая нуклеиновая кислота отличается от первой, второй, третьей и четвертой нуклеиновых кислот. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения способы дополнительно включают приведение клетки в контакт *in vitro* по меньшей мере с шестой липидной композицией, содержащей шестую нуклеиновую кислоту, при этом шестая нуклеиновая кислота отличается от первой, второй, третьей, четвертой и пятой нуклеиновых кислот. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере две липидные композиции вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере две липидные композиции вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения размноженная клетка демонстрирует повышенную выживаемость.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота по любому из вышеуказанных способов получения множественных редакций генома в культивируемой *in vitro* клетке представляет собой РНК, такую как gРНК. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС

мере одна из вышеуказанных липидных композиций содержит инструмент редактирования генома нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы по настоящему изобретению дополнительно включают приведение клетки в контакт с донорной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения липидная композиция дополнительно содержит донорную нуклеиновую кислоту. Донорная нуклеиновая кислота может быть встроена в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность донорной нуклеиновой кислоты представлена в виде вектора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения донорная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения донорная нуклеиновая кислота содержит области, имеющие гомологию с соответствующими областями последовательности рецептора Т-клеток. «Нацеливающий рецептор» представляет собой полипептид, присутствующий на поверхности клетки, например, Т-клетки, для обеспечения связывания клетки с целевым сайтом, например, конкретной клеткой или тканью в организме. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой CAR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой конструкцию слияния Т-клеточных рецепторов (TRuC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR) (например, экспрессированный на В-клетке). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы редактирования генома *in vitro* позволили достичь высокой эффективности редактирования множества целевых сайтов в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутирован эндогенный TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутирована экспрессия эндогенного TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой два гена

имеют сниженную экспрессию и/или нокаутированы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены три гена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены четыре гена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены пять генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены шесть генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены семь генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены восемь генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены девять генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены десять генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой нокаутированы и/или отключены одиннадцать генов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения получают сконструированную Т-клетку, в которой эндогенный TCR нокаутирован, а трансгенный TCR вставлен и экспрессирован. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения tgTCR нацелен на опухоль Вильмса 1 (WT1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения WT1 tgTCR вводят в высокую долю Т-клеток (например, более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%) с помощью описанной липидной композиции.

Термины « β 2М» или «B2M» применяются в данном документе взаимозаменяемо и со ссылкой на последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность белка β -2 микроглобулина; человеческий ген имеет номер доступа NC_000015 (диапазон 44711492..44718877), ссылка GRCh38.p13. Белок B2M связан с молекулами МНС класса I в виде гетеродимера на поверхности ядерных клеток и необходим для экспрессии белка МНС класса I.

Термины «СПТА» или «CITA» или «C2TA» применяются в данном документе взаимозаменяемо и со ссылкой на последовательность нуклеиновой кислоты или белковой последовательности транскриптора главного комплекса гистосовместимости класса II; ген человека имеет номер доступа NC_000016.10 (диапазон 10866208..10941562), ссылка GRCh38.p13, которая включена в данный документ посредством ссылки. Белок СПТА в ядре действует как положительный регулятор транскрипции гена МНС класса II и необходим для экспрессии белка МНС класса II.

МНС или молекула(ы) МНС, или белок МНС, или комплекс(ы) МНС относятся к молекуле (или во множественном числе) основного комплекса гистосовместимости и включают, например, молекулы МНС класса I и МНС класса II. У людей молекулы МНС называются комплексами лейкоцитарного антигена человека или молекулами HLA, или белком HLA. Применение терминов «МНС» и «HLA» не предназначено для ограничения; применяемый в данном документе термин «МНС» может применяться для обозначения молекул МНС человека, т.е. молекул HLA. Поэтому термины «МНС» и «HLA» применяются в данном документе взаимозаменяемо.

Термин «HLA-A», применяемый в данном документе в контексте белка HLA-A, относится к молекуле белка МНС класса I, которая представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи (кодируемой геном HLA-A) и легкой цепи (т.е. бета-2 микроглобулина). Применяемый в данном документе термин «HLA-A» или «ген HLA-A», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-A. Ген HLA-A также относится к гистосовместимости HLA класса I, А альфа-цепи; ген человека имеет номер доступа NC_000006.12 (29942532..29945870), который включен в данный документ посредством ссылки. Известно, что ген HLA-A имеет сотни различных версий (также называемых аллелями) в популяции (и индивидуум может получить два разных аллеля гена HLA-A). Все аллели HLA-A охватываются терминами «HLA-A» и «ген HLA-A».

Термин «HLA-B», применяемый в данном документе в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь белковой молекулы HLA-B. HLA-B также относится к гистосовместимости HLA класса I, В альфа-цепи; ген человека имеет номер доступа NC_000006.12 (31353875..31357179), который включен в данный документ посредством ссылки.

Термин «HLA-C», применяемый в данном документе в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь белковой молекулы HLA-C. HLA-C также относится к гистосовместимости HLA класса I, С альфа-цепи; ген человека имеет номер доступа NC_000006.12 (31268749..31272092), который включен в данный документ посредством ссылки.

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 настоящего изобретения 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 настоящего изобретения каркас нуклеазы Cas и gРНК будет происходить из одной и той же системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 18-24 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 19-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения sgРНК представляет собой «sgРНК Cas9», способную опосредовать РНК-направляемое расщепление ДНК посредством белка Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения sgРНК представляет собой «Cpf1 sgРНК», способную опосредовать РНК-направленное расщепление ДНК посредством белка Cpf1. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК содержит crРНК и tracrРНК, достаточные для образования активного комплекса с белком Cas9 и опосредования РНК-направляемого расщепления ДНК. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения gРНК содержит crРНК, достаточную для образования активного комплекса с белком Cpf1 и опосредования РНК-направляемого расщепления ДНК. См. Zetsche 2015.

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения также обеспечивают нуклеиновые кислоты, *например*, кассеты экспрессии, кодирующие описанную в данном документе gРНК. Термин «нуклеиновая кислота гидовой РНК» применяется в данном документе для обозначения gРНК (*например*, sgРНК или dgРНК) и кассеты экспрессии gРНК, которая представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или большее количество gРНК.

Модифицированные РНК

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

Модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды могут присутствовать в РНК, *например*, gРНК или mРНК. gРНК или mРНК, содержащая один или большее количество модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, *например*, называется «модифицированной» РНК для описания присутствия одного или большего количества неприродных и/или встречающихся в природе компонентов или конфигураций, которые применяются вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, С и U. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная РНК синтезируется с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, называемым в данном документе «модифицированным».

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать один или большее количество из следующего: (i) изменение, *например*, замена одного или обоих не связывающих фосфатных атомов кислорода и/или одного или большего количества связывающих фосфатных атомов кислорода в фосфодиэфирной связи основной цепи (типичная модификация основной цепи); (ii) изменение, *например*, замена компонента

рибозного сахара, *например*, 2'-гидроксила на рибозном сахаре (типичная модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента «дефосфо» линкерами (типичная модификация основной цепи); (iv) модификация или замена встречающегося в природе нуклеинового основания, в том числе неканоническим нуклеиновым основанием (типичная модификация основания); (v) замена или модификация рибозофосфатного остова (типичная модификация основной цепи); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца полинуклеотида, *например*, удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3'- или 5'-кэпа могут включать в себя модификацию сахара и/или основной цепи); и (vii) модификация или замена сахара (типичная модификация сахара). Определенные варианты осуществления настоящего изобретения содержат модификацию на 5'-конце мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Определенные варианты осуществления настоящего изобретения содержат модификацию мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Определенные варианты осуществления настоящего изобретения 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 большее количество модифицированных остатков в неконцевых положениях. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения гРНК содержит по меньшей мере один модифицированный остаток. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения мРНК содержит по меньшей мере один модифицированный остаток. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная гРНК содержит модификацию одного или большего количества из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированная гРНК содержит модификацию одного или большего количества из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце. Композиция LNP по пп. 52 или 53, в которой модифицированная гРНК содержит модификацию одного или большего количества из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце.

Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены деградации, *например*, внутриклеточными нуклеазами или нуклеазами, обнаруженными в сыворотке. *Например*, нуклеазы могут гидролизовать 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 настоящего изобретения модифицированные молекулы РНК, описанные в данном документе, могут вызывать снижение врожденного иммунного ответа 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, а также гибель клеток.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 и, в частности, в отношении РНК, относятся к усиленной или повышенной устойчивости к деградации, например, нуклеазами (т.е. эндонуклеазами или экзонуклеазами), 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, организме субъекта и/или цитоплазме. Стабилизированные молекулы РНК или нуклеиновых кислот, представленные в данном документе, демонстрируют более длительный период полужизни по сравнению с их встречающимися в природе 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 Kozak). (Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20): 8125-48 (1987)).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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», применяемая в данном документе, включает модификации, которые вводят химические свойства, отличающиеся от тех, которые наблюдаются в РНК или нуклеиновых кислотах, встречающимися в природе, например, ковалентные модификации, такие как введение модифицированных нуклеотидов (например, аналогов нуклеотидов или включение подвесных групп, которые в природе не встречаются в РНК, таких как дезоксиинуклеозид, или молекул нуклеиновых кислот).

В некоторых вариантах осуществления модификации основной цепи, фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или большего количества 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 настоящего изобретения модификация основной фосфатной цепи может включать изменения, которые приводят к получению либо незаряженного линкера, либо заряженного линкера с несимметричным распределением заряда.

Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные фосфатные эфиры борана, гидрофосфонаты, фосфоамидаты, 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 документе Rp) или конфигурацию «S» (в данном документе Sp). Основную цепь также можно модифицировать путем замены мостикового кислорода (*то есть*, кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) азотом (мостиковые фосфоамидаты), серой (мостиковые фосфоротиоаты) и углеродом (мостиковые метиленфосфонаты). Замена может происходить или в линкерном кислороде, или в обоих линкерных кислородах. В некоторых модификациях основной цепи 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, тиоэфир, этиленоксидный линкер, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленимимино, метиленимино, метиленимино, метиленимино, метиленимино, метиленимино, метиленимино, метиленимино и метиленимино.

mРНК

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция или состав, описанные в данном документе, содержат mРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas или нуклеаза Cas класса 2, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлена, применяется или вводится mРНК, содержащая ORF, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas или нуклеаза Cas класса 2. mРНК может содержать один или большее количество из следующих элементов: 5' кэп, 5' нетранслируемая область (UTR), 3'-UTR и полиадениновый хвост. mРНК может содержать модифицированную открытую

рамку считывания, например, для кодирования последовательности ядерной локализации или для применения альтернативных кодонов для кодирования белка.

mРНК в описанных композициях LNP может кодировать полипептид клеточной поверхности или внутриклеточный полипептид. mРНК в описанных композициях LNP может кодировать, например, секретируемый гормон, фермент, рецептор, полипептид, пептид или другой представляющий интерес белок, который обычно секретируется. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения mРНК может необязательно иметь химические или биологические модификации, которые, например, улучшают стабильность и/или период полужизни такой mРНК или которые улучшают или иным образом облегчают выработку белка.

Кроме того, подходящие модификации включают изменения в одном или большем количестве нуклеотидах кодона, так что кодон кодирует ту же аминокислоту, но является более стабильным, чем кодон, обнаруженный в версии mРНК 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 настоящего изобретения количество остатков С и/или U в последовательности mРНК уменьшается. В другом варианте осуществления настоящего изобретения количество остатков С и/или U уменьшается за счет замены одного кодона, кодирующего конкретную аминокислоту, на другой кодон, кодирующий ту же или родственную аминокислоту. Предполагаемые модификации нуклеиновых кислот mРНК включают также встраивание псевдоуридинов. Встраивание псевдоуридинов в нуклеиновые кислоты mРНК может способствовать повышению стабильности и трансляционной способности, а также снижению иммуногенности *in vivo*. См., например, Karikó, K., et al., *Molecular Therapy* 16 (11): 1833-1840 (2008). Замены и модификации mРНК могут быть осуществлены с помощью способов, известных специалистам в данной области техники.

Ограничения на уменьшение количества остатков С и U в последовательности, вероятно, будут больше в кодирующей области mРНК по сравнению с нетранслируемой областью (т. е., вероятно, будет невозможно удалить все остатки С и U присутствующие в матрице, сохраняя при этом способность матрицы кодировать желаемую аминокислотную последовательность). Однако вырожденность генетического кода дает возможность уменьшить количество остатков С и/или U, присутствующих в последовательности, сохраняя при этом ту же кодирующую способность (т. е. в зависимости от того, какая аминокислота кодируется кодоном, возможны несколько различных вариантов модификации последовательностей РНК).

Термин «модификация» также включает, например, встраивание ненуклеотидных связей или модифицированных нуклеотидов в последовательности mРНК (например, модификации одного или обоих 3'- и 5'-концов молекулы mРНК, кодирующей функциональный секретируемый белок или фермент). Такие модификации включают

добавление оснований к последовательности 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) и включение элементов, изменяющих структуру молекулы мРНК (например, образующих вторичные структуры).

Считается, что поли(А)-хвост стабилизирует естественные мессенджеры. Поэтому к молекуле мРНК может быть добавлен длинный поли(А)-хвост, что делает мРНК более стабильной. Поли(А)-хвосты можно добавлять с применением различных известных в данной области технологий. Например, длинные поли(А)-хвосты могут быть добавлены к синтетической или транскрибируемой *in vitro* мРНК с помощью поли-А полимеразы (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Транскрипционный вектор может также кодировать длинные поли(А)-хвосты. Кроме того, поли(А)-хвосты могут быть добавлены путем транскрипции непосредственно из продуктов ПЦР. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения длина поли(А)-хвоста составляет по меньшей мере около 90, 200, 300, 400, по меньшей мере 500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения длина поли(А)-хвоста регулируется для контроля стабильности модифицированной молекулы мРНК и, соответственно, транскрипции белка. Например, поскольку длина поли(А)-хвоста может влиять на период полужизни молекулы мРНК, длину поли(А)-хвоста можно регулировать для изменения уровня устойчивости мРНК к действию нуклеаз и, тем самым контролировать динамику экспрессии белка в клетке. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стабилизированные молекулы мРНК достаточно устойчивы к деградации *in vivo* (например, под действием нуклеаз), что позволяет доставлять их в клетку-мишень без носителя.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения мРНК может быть модифицирована путем встраивания 3' и/или 5' нетранслируемых (UTR) последовательностей, которые не встречаются в мРНК дикого типа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в нуклеотидную последовательность молекулы мРНК, кодирующей терапевтический или функциональный белок, может быть включена 3' и/или 5' фланкирующая последовательность, которая естественным образом фланкирует мРНК и кодирует второй, неродственный белок, с целью ее модификации. Например, 3' или 5' последовательности из стабильных молекул мРНК (например, глобина, актина, GAPDH, тубулина, гистона или ферментов цикла лимонной кислоты) могут быть встроены в 3' и/или 5' область молекулы смысловой мРНК нуклеиновой кислоты для повышения стабильности молекулы смысловой мРНК. См., например, US2003/0083272.

Более подробное описание модификаций мРНК можно найти в публикации US2017/0210698A1 на стр. 57-68, содержание которой включено в данный документ.

Матричная нуклеиновая кислота

Способы, описанные в данном документе, могут включать применение матричной

нуклеиновой кислоты. Матрица может быть применена для изменения или вставки последовательности нуклеиновой кислоты в целевой сайт для РНК-направляемого ДНК-связывающего белка, такого как нуклеаза Cas, например, нуклеаза Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают введение матрицы в клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения может предлагаться одна матрица. В других вариантах осуществления настоящего изобретения могут предлагаться две или большее количество матриц, что позволяет осуществлять редактирование в двух или большем количестве целевых сайтов. Например, могут предлагаться различные матрицы для редактирования одного гена в клетке или двух разных генов в клетке.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения матрица может быть применена в гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гомологичная рекомбинация может привести к интеграции последовательности матрицы или части последовательности матрицы в целевую молекулу нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления настоящего изобретения матрица может быть применена в гомологически-направленной репарации, которая предполагает вторжение цепи ДНК в сайт расщепления в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гомологически направленная репарация может привести к включению матричной последовательности в отредактированную целевую молекулу нуклеиновой кислоты. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения матрица может быть применена для редактирования гена, опосредованного негомологичным концевым соединением. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность матрицы не имеет сходства с последовательностью нуклеиновой кислоты вблизи сайта расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения матрица или часть последовательности матрицы является встроенной. В некоторых вариантах осуществления изобретения матрица включает фланкирующие последовательности инвертированных концевых повторов (ITR).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность матрицы может соответствовать, включать или состоять из эндогенной последовательности клетки-мишени. Она также или альтернативно может соответствовать, включать или состоять из экзогенной последовательности клетки-мишени. В контексте данного документа 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, нативное расположение которой в геноме клетки находится в другом месте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эндогенная последовательность может представлять собой геномную последовательность клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эндогенная последовательность может быть хромосомной или

внехромосомной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эндогенная последовательность может представлять собой плазмидную последовательность клетки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения матрица содержит ssДНК или dsДНК, содержащие фланкирующие последовательности инвертированных концевых повторов (ITR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения матрица предлагается в виде вектора, плазмиды, миникольца, нанокольца или продукта ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота является очищенной. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту очищают методом преципитации (*например*, преципитацией LiCl, преципитацией спиртом или эквивалентным способом, *например*, описанным в данном документе). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту очищают хроматографическим методом, таким как метод HPLC или эквивалентным методом (*например*, описанным в данном документе). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновую кислоту очищают как с помощью метода преципитации (*например*, преципитации LiCl), так и с помощью метода HPLC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновую кислоту очищают с помощью тангенциальной проточной фильтрации (TFF).

Типы клеток

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой иммунную клетку. В контексте данного документа «иммунная клетка» означает клетку иммунной системы, включая, *например*, лимфоцит (*например*, Т-клетку, В-клетку, естественную клетку-киллер («НК-клетку» и НКТ-клетку или iНКТ-клетку)), моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит (*например*, нейтрофил, эозинофил и базофил). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой первичную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка иммунной системы может быть выбрана из CD3+, CD4+ и CD8+ Т-клеток, регуляторных Т-клеток (Treg), В-клеток, НК-клеток и дендритных клеток (DC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммунная клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой клетку адаптивного иммунитета. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой Т клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой В клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой НК-клетку.

В контексте данного документа под Т-клеткой понимается клетка, экспрессирующая Т-клеточный рецептор («TCR», « $\alpha\beta$ TCR» или « $\gamma\delta$ TCR»), однако в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения TCR Т-клетки может быть

генетически модифицирован для снижения его экспрессии (*например*, путем генетической модификации генов TRAC или TRBC), поэтому экспрессия белка CD3 может быть применена в качестве маркера для идентификации Т-клетки стандартными методами проточной цитометрии. CD3 представляет собой мультисубъединичный сигнальный комплекс, который ассоциируется с TCR. Таким образом, Т-клетка может обозначаться как CD3+. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка представляет собой клетку, экспрессирующую маркер CD3+ и маркер CD4+ или CD8+.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD8 и, следовательно, представляет собой CD8+ по стандартным методам проточной цитометрии и может быть названа «цитотоксической» Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD4 и, следовательно, представляет собой CD4+ по стандартным методам проточной цитометрии и может быть названа «хелперной» Т-клеткой. CD4+ Т-клетки могут дифференцироваться в подмножества и называться Th1-клетками, Th2-клетками, Th9-клетками, Th17-клетками, Th22-клетками, Т-регуляторными («Treg») клетками или Т-фолликулярными хелперными клетками («Tfh»). Каждое подмножество CD4+ выделяет специфические цитокины, которые могут выполнять как провоспалительные, так и противовоспалительные функции, функции выживания или защиты. Т-клетки могут быть выделены от субъекта методами селекции CD4+ или CD8+.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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 инфицированных тканях (эффektorные Т-клетки памяти). Т-клетка памяти может представлять собой CD8+ Т-клетку. Т-клетка памяти может представлять собой CD4+ Т-клетку. В контексте данного документа «центральная Т-клетка памяти» может быть определена как Т-клетка, знакомая с антигеном, и, например, может экспрессировать CD62L и CD45RO. Центральные Т-клетки памяти могут быть обнаружены как CD62L+ и CD45RO+ с помощью стандартных методов проточной цитометрии. Центральные Т-клетки памяти также экспрессируют CCR7, поэтому могут быть обнаружены как CCR7+ с помощью стандартных методов проточной цитометрии.

В контексте данного документа «ранняя стволовая Т-клетка памяти» (или «Tscm») может быть определена как Т-клетка, экспрессирующая CD27 и CD45RA и, следовательно, являющаяся CD27+ и CD45RA+, что определяется при использовании стандартных методов проточной цитометрии. Tscm не экспрессирует CD45 изоформу CD45RO, поэтому при окрашивании на эту изоформу стандартными методами проточной цитометрии Tscm в дальнейшем будет называться CD45RO-. Таким образом, CD45RO-CD27+ клетки также являются ранними стволовыми Т-клетками памяти. Клетки Tscm дополнительно экспрессируют CD62L и CCR7, поэтому их можно обнаружить как CD62L+ и CCR7+ стандартными методами проточной цитометрии. Было показано, что

ранние стволовые Т-клетки памяти. коррелируют с повышенной персистенцией и терапевтической эффективностью препаратов клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой В клетку. В контексте данного документа «В-клетка» может быть определена как клетка, которая экспрессирует CD19 и/или CD20 и/или зрелый антиген В-клеток («ВСМА»), и, следовательно, В-клетка представляет собой CD19+ и/или CD20+, и/или ВСМА+, что определяется при использовании стандартных методов проточной цитометрии. В-клетка также является отрицательной по CD3 и CD56, что определяется при использовании стандартных методов проточной цитометрии. В-клетка может представлять собой плазматическую клетку. В-клетка может представлять собой В-клетку памяти. В-клетка может представлять собой «наивную» В-клетку. В-клетка может представлять собой IgM+ или иметь рецептор В-клеток с переключенным классом (*например*, IgG+ или IgA+).

Включены клетки, применяемые 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); нервные стволовые клетки (NSC); лимбальные стволовые клетки (LSC); или тканеспецифические первичные клетки или клетки, полученные из них (TSC). Клетки, применяемые в терапии АСТ, дополнительно включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), которые можно индуцировать 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 настоящего изобретения клетка представляет собой человеческую клетку, например, клетку субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку выделяют у человека, такого как человек-донор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку выделяют из человеческих донорных РВМС или лейкопаков. В некоторых вариантах осуществления клетка получают от субъекта с патологическим состоянием, нарушением или заболеванием. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку получают от человека-донора с вирусом Эпштейна-Барр («EBV»).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой моноклеарную клетку, например, из костного мозга или периферической крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой моноклеарную клетку периферической крови («РВМС»). В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой РВМС, *например*, лимфоцит или моноцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой лимфоцит периферической крови («PBL»).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы осуществляются *ex vivo*. В контексте данного документа «*ex vivo*» относится к методу *in vitro*, при котором клетку можно переносить субъекту, *например*, в виде терапии АСТ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения метод *ex vivo* представляет собой метод *in vitro*, включающий клетки или популяцию клеток для терапии АСТ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка поддерживается в культуре. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку пересаживают пациенту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку удаляют у субъекта, генетически модифицируют *ex vivo*, а затем вводят обратно тому же пациенту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку удаляют из организма субъекта, генетически модифицируют *ex vivo*, а затем вводят субъекту, отличному от субъекта, из которого она была удалена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка происходит из клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточную линию получают от человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная линия представляет собой лимфобластоидную клеточную линию («LCL»). Клетка может быть криоконсервирована и разморожена. Клетка могла ранее не подвергаться криоконсервации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка происходит из банка клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку генетически модифицируют, а затем переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку удаляют из организма субъекта, генетически модифицируют *ex vivo*, и переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированную популяцию клеток переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированную популяцию иммунных клеток переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированную популяцию иммунных клеток, содержащую первую и вторую субпопуляции, переносят в банк клеток, при этом первая и вторая субпопуляции имеют по меньшей мере одну общую генетическую модификацию и по меньшей мере одну отличающуюся генетическую модификацию.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетку активируют путем поликлональной активации (или «поликлональной стимуляции») (а не антигенспецифической стимуляции). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетку активируют стимуляцией CD3 (*например*, предоставлением

антитела анти-CD3). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетку активируют стимуляцией CD3 и CD28 (*например*, предоставлением антитела анти-CD3 и антитела анти-CD28). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетку активируют с использованием готового к использованию реагента для активации Т-клетки (*например*, посредством стимуляции CD3/CD28). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетку активируют посредством стимуляции CD3/CD28, обеспечиваемой гранулами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетку активируют посредством стимуляции CD3/CD28, при этом один или большее количество компонентов являются растворимыми и/или один или большее количество компонентов связаны с твердой поверхностью (*например*, планшетом или гранулой). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетку активируют антиген-независимым митогеном (*например*, лектином, включая, *например*, конканавалин А («ConA») или РНА).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для активации Т-клеток используют один или большее количество цитокинов. IL-2 необходим для активации Т-клеток и/или для содействия выживанию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения цитокин(ы) для активации Т-клеток представляет собой цитокин, который связывается с рецептором общей гамма-цепи (γc). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для активации Т-клеток предлагается IL-2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для активации Т-клеток предлагается IL-7. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для активации Т-клеток предлагается IL-15. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для активации Т-клеток предлагается IL-21. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для активации Т-клеток предлагается комбинация цитокинов, включая, например, IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 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»). Родственный антиген может быть представлен Т-клетке путем совместного культивирования Т-клетки с антигенпредставляющей клеткой (фидерной клеткой) и антигеном. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетку активируют путем совместного культивирования с антигенпредставляющей клеткой, в которую был введен антиген. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в антигенпрезентирующую клетку вводили пептид антигена.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка может быть активирована на срок от 12 до 72 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка может быть активирована на срок от 12 до 48 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка может быть активирована на срок от 12 до 24 часов. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения Т-клетка может быть активирована на срок от 24 до 48 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка может быть активирована на срок от 24 до 72 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка может быть активирована на срок, составляющий 12 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка может быть активирована на срок, составляющий 48 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка может быть активирована на срок, составляющий 72 часа.

Хотя изобретения описаны в связи с проиллюстрированными вариантами их 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 превалярующим. Все диапазоны, указанные в заявке, охватывают конечные точки, если не указано иное.

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 тому подобное. 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. Используемые в этой 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 некоторых 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).

В контексте данного документа термин «приведение в контакт» означает установление физической связи между двумя или большим количеством объектов. 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.

В контексте данного документа 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 контактирование одной или нескольких клеток с композицией наночастиц.

В контексте данного документа 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 приготовлении 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%. Используемый в данном документе термин «инкапсуляция» может относиться к полной, значительной или частичной капсуляции, ограничению, окружению или заключению в оболочку.

В контексте данного документа 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 настоящего изобретения 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).

В контексте данного документа 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).

Применяемый в настоящем документе 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.

В контексте данного документа термин «биоразлагаемый» используется для обозначения материалов, которые при введении в клетки разрушаются клеточными механизмами (*например*, ферментативной деградацией) или гидролизом на компоненты, которые клетки могут повторно использовать или утилизировать без значительного токсического воздействия(й) на клетки. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения компоненты, образующиеся при разложении биоразлагаемого материала, не вызывают воспаления и/или других неблагоприятных эффектов *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемые материалы расщепляются ферментативно. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биоразлагаемые материалы разрушаются путем

гидролиза.

В контексте данного документа «соотношение N/P» представляет собой молярное соотношение ионизируемого атома азота, содержащего липид(например, соединение формулы I) к фосфатным группам в РНК, например, в композиции наночастиц, включающей липидный компонент и РНК.

Композиции также могут содержать соли одного или большего количества соединений. Соли могут быть фармацевтически приемлемыми солями. В контексте данного документа 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, помимо прочего, соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, такие как карбоновые кислоты; и тому подобное. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, уксусную кислоту, адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензолсульфовую кислоту, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанепропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогоптонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 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, валератные соли и тому подобное. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению включают обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную составляющую, с помощью обычных химических методов. Как правило, такие соли можно получать взаимодействием 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 можно найти в публикациях Remington's Pharmaceutical Sciences 17^o изд., 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, и Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В контексте данного документа 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.

В контексте данного документа термин «трансфекция» относится к введению вида (например, РНК) в клетку. Трансфекция может происходить, например, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Термин «алкил», в контексте данного документа, представляет собой разветвленную или неразветвленную насыщенную углеводородную группу из 1-24 атомов углерода, такую как метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *s*-бутил, *t*-бутил, *n*-пентил, изопентил, *s*-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 большим количеством групп, включая, помимо прочего, алкил, циклоалкил, алкокси, амино, 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», в контексте данного документа, относится к алифатической группе, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь, 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 большем количестве атомов углерода алкенильной группы. Такие заместители могут встречаться на одном или большем количестве атомов углерода, которые включены или не включены в одну или большее количество 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 несколькими алкильными, карбоциклическими, арильными, гетероциклическими или гетероарильными группами. Иллюстративные алкенильные группы включают, но не ограничиваются ими, винил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), алил ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), циклопентил ($-\text{C}_5\text{H}_7$), 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, помимо прочего, $-CH(CH_3)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)-$, $-CH_2C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ и т. п. Алкиленовая группа также может быть замещенной или незамещенной. Например, алкиленовая группа может быть замещена одной или большим количеством групп, включая, помимо прочего, алкил, 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 углерод-углеродную связь и, в одном варианте осуществления, отсутствие тройных углерод-углеродных связей. 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.

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 алкокси группы включают метокси, этокси, пропокси, трет-бутокси и т. п.

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 в качестве 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 методы

Пример 1.1. Состав липидных наночастиц («LNP»)

Компоненты LNP растворяли в 100% этаноле в различных молярных соотношениях. Груз РНК (например, mРНК Cas9 и sgРНК) растворяли в 25 мМ цитрата, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация груза РНК составляла

приблизительно 0,45 мг/мл. LNP составляли с молярным соотношением липидного амина и фосфата РНК (N:P) около 6, а соотношение sgРНК и mРНК Cas9 составляло 1:2 по весу, если не указано иное.

LNP готовили с применением различных аминных липидов в 4-компонентной липидной системе. Если не указано иное, LNP содержали ионизируемый липид, Соединение 6, ((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), DSPC, холестерин и PEG2k-DMG.

LNP готовили с помощью метода перекрестного потока с применением 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 и дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.). LNP концентрировали с помощью тангенциальной проточной фильтрации, например, на картридже с плоским листом (Sartorius, MWCO 100 кДа), и необязательно 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 альтернативном варианте LNP необязательно концентрировали с применением центрифужного фильтра Amicon 100 кДа, а буфер заменяли с помощью колонок для обессоливания PD-10 (GE) на TSS. Полученную смесь затем фильтровали с помощью 0,2 мкм стерильного фильтра. Конечный продукт LNP хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего применения.

Пример 1.2. Транскрипция *in vitro* («IVT») mРНК нуклеазы

Кэпированную и полиаденилированную mРНК, содержащую N1-метил-псевдо-U, получали путем транскрипции *in vitro* с применением матрицы линейаризованной плазмидной ДНК и T7 РНК-полимеразы. 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/мкл 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 mРНК 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-метил-псевдо-UTP (Trilink); 10-25 мМ ARCA (Trilink); 5 Ед/мкл T7 РНК-полимеразы (NEB); 1 Ед/мкл ингибитора мышьяковой 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 HPLC. Вкратце, после расщепления ДНКазой, мРНК очищали с применением преципитации LiCl, преципитации ацетатом аммония и преципитации ацетатом натрия. В случае мРНК, очищенной посредством HPLC, после преципитации и восстановления LiCl, мРНК очищали с помощью RP-IP HPLC (см., например, Kariko, et al. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 21 e142). Фракции, выбранные для объединения, комбинировали и обессоливали преципитацией ацетатом натрия/этанолом, 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: 1-3 (см. последовательности в Таблице 35). Когда 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 35.

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

Пример 1.4 Анализ составов

Метод с динамическим рассеиванием света («DLS») применяли для определения индекса полидисперсности («*pdi*») и размера LNP по настоящему изобретению. Метод DLS измеряет рассеивание света, возникающее при воздействии на образец источником 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.

Система асимметричного проточного фракционирования частиц в поперечном гравитационном поле - многоугольного рассеяния света (AF4-MALS) используется для разделения частиц в композиции по гидродинамическому радиусу, а затем для измерения молекулярных масс, гидродинамических радиусов и среднеквадратичных радиусов фракционированных частиц. Этот метод позволяет оценивать молекулярно-массовое распределение и распределение частиц по размеру, а также вторичные характеристики, такие как график Burchard-Stockmeyer (отношение среднеквадратического значения радиуса («*rms*») к гидродинамическому радиусу во времени, которое указывает на внутреннюю плотность ядра частицы) и график *rms* конформации (логарифм

среднеквадратичного значения радиуса по сравнению с логарифмом молекулярного веса, где угловой коэффициент полученной линейной аппроксимации дает степень компактности в зависимости от удлинения).

Криоэлектронная микроскопия («крио-ЭМ») может использоваться для определения размера частиц, морфологии и структурных характеристик LNP.

Анализ липидного состава LNP определяли с помощью жидкостной хроматографии с последующей детекцией заряженного аэрозоля (LC-CAD). Этот анализ обеспечивает сравнение фактического содержания липидов с номинальным.

Композиции LNP анализировали на средний размер частиц, индекс полидисперсности (pdi), общее содержание РНК, эффективность инкапсуляции РНК и дзета-потенциал. Композиции LNP можно дополнительно охарактеризовать с помощью анализа липидов, AF4-MALS, NTA и/или крио-ЭМ. Средний размер частиц и полидисперсность измеряли с помощью динамического рассеяния света (DLS) с помощью прибора Malvern Zetasizer DLS. Образцы LNP разбавляли PBS раствором перед измерением с помощью DLS. Z-средний диаметр был представлен вместе со среднечисловым диаметром и pdi. Среднее значение Z представляет собой средневзвешенный по интенсивности средний гидродинамический размер совокупности частиц и измерен с применением метода динамического рассеяния света. Среднее число представляет собой средневзвешенный по числу частиц средний гидродинамический размер совокупности частиц, измерен с помощью динамического рассеяния света. Прибор Malvern Zetasizer применяли для измерения дзета-потенциала LNP. Образцы разбавляли 1:17 (50 мкл на 800 мкл) в 0,1X PBS, pH 7,4 перед измерением.

Эффективность инкапсуляции рассчитывали как (Общая РНК - Свободная РНК)/Общая РНК. Анализ на основе флуоресценции (Ribogreen®, ThermoFisher Scientific) применяли для определения концентрации общей РНК и свободной РНК. Образцы LNP разбавляли соответствующим образом 1x буфером TE, содержащим 0,2% Triton-X 100, для определения общей РНК или 1x буфером TE для определения свободной РНК. Стандартные кривые получали с применением исходного раствора РНК, применяемого для составления композиций, и разбавленного в 1x буфере TE +/- 0,2% Triton-X 100. Затем к каждому из стандартов и образцов добавляли разбавленный краситель RiboGreen® (в соответствии с инструкциями производителя) и оставляли для инкубации в течение приблизительно 10 минут при комнатной температуре в отсутствие света. Ридер для микропланштов SpectraMax M5 (Molecular Devices) применяли для считывания образцов с длинами волн возбуждения, автоматической отсечки и излучения, установленными на 488 нм, 515 нм и 525 нм, соответственно. Общую РНК и свободную РНК определяли по соответствующим стандартным кривым.

AF4-MALS применяли для анализа распределения по молекулярным массам и размерам частиц, а также вторичных статистических данных из этих расчетов. LNP разбавляли соответствующим образом и вводили в разделяющий канал AF4 с помощью автосэмплера HPLC, где они фокусируются, а затем элюировали с экспоненциальным

градиентом в поперечном потоке через канал. Вся жидкость приводилась в действие насосом HPLC и прибором Wyatt Eclipse. Частицы, элюирующиеся из канала AF4, проходят через УФ-детектор, детектор многоугольного лазерного светорассеяния, детектор квазиупругого рассеяния света и дифференциальный рефрактометрический детектор. Необработанные данные обрабатывали с применением модели Дебая для определения молекулярной массы и среднеквадратичного радиуса из сигналов детектора.

CAD представляет собой разрушающий масс-детектор, который обнаруживает все нелетучие соединения, и сигнал является постоянным независимо от структуры аналита.

Липидные компоненты в LNP количественно анализировали с помощью HPLC с присоединенным детектором заряженных аэрозолей (CAD). Хроматографическое разделение 4 липидных компонентов достигали с помощью обращенно-фазовой HPLC. С помощью HPLC-анализа липидов были получены фактические молярные проценты (моль-%) липидов для каждого компонента композиций LNP, описанных в следующих примерах, как показано в Таблице 1.

Таблица 1. Результаты анализа липидов для композиций LNP

ID LNP	Молярное соотношение (номинальное)	Фактический или измеренный моль %			
		Соединение 6	DSPC	Холестерин	PEG
КОМПОЗИЦИЯ 1	50/10/38,5/1,5	49,4%	11,5%	37,5%	1,7%
КОМПОЗИЦИЯ 2	50/5/43,5/1,5	46,6%	4,8%	46,6%	1,9%
КОМПОЗИЦИЯ 3	45/15/38,5/1,5	42,1%	16,3%	39,7%	1,8%
КОМПОЗИЦИЯ 4	45/5/48,5/1,5	42,2%	5,8%	50,2%	1,8%
КОМПОЗИЦИЯ 5	40/10/48,5/1,5	38,9%	11,0%	48,4%	1,7%
КОМПОЗИЦИЯ 6	30/10/58,5/1,5	24,7%	9,8%	63,9%	1,6%
КОМПОЗИЦИЯ 7	30/5/63,5/1,5	25,9%	5,5%	66,8%	1,8%
КОМПОЗИЦИЯ 8	55/5/38,5/1,5	52,9%	6,1%	39,4%	1,5%
КОМПОЗИЦИЯ 9	55/10/33,5/1,5	51,7%	11,5%	35,0%	1,8%
КОМПОЗИЦИЯ 10	65/5/28,5/1,5	66,8%	5,9%	25,5%	1,7%
КОМПОЗИЦИЯ 11	50/10/38,5/1,5	46,4%	11,0%	41,0%	1,6%
КОМПОЗИЦИЯ 12	50/10/38,5/1,5	45,6%	11,8%	40,6%	2,0%
КОМПОЗИЦИЯ 1	50/10/38,5/1,5	45,8%	12,2%	40,3%	1,6%
КОМПОЗИЦИЯ 13	30/5/62,5/2,5	23,7%	5,5%	68,3%	2,6%
КОМПОЗИЦИЯ 14	35/10/52,5/2,5	30,6%	10,4%	56,0%	3,0%
КОМПОЗИЦИЯ 15	35/10/53,5/1,5	31,6%	11,4%	55,4%	1,6%
КОМПОЗИЦИЯ 16	35/15/47,5/2,5	31,7%	16,1%	49,3%	3,0%
КОМПОЗИЦИЯ 5	40/10/48,5/1,5	39,3%	10,5%	48,6%	1,6%

КОМПОЗИЦИЯ 17	40/15/43,5/1,5	37,0%	16,4%	45,0%	1,7%
КОМПОЗИЦИЯ 18	45/10/43,5/1,5	42,9%	11,6%	43,8%	1,6%
КОМПОЗИЦИЯ 19	40/10/48,5/1,5	34,2%	10,2%	53,9%	1,7%
КОМПОЗИЦИЯ 20	40/10/48,5/1,5	38,1%	12,3%	47,9%	1,7%
КОМПОЗИЦИЯ 21	50/9/39,5/1,5	46,8%	10,1%	41,5%	1,5%
КОМПОЗИЦИЯ 22	50/9/39,5/1,5	46,3%	11,1%	41,0%	1,5%
КОМПОЗИЦИЯ 23	35/15/47,5/2,5	32,9%	15,2%	49,2%	2,7%
КОМПОЗИЦИЯ 24	37,2/9,6/50,5/2,7	34,9%	9,8%	52,4%	2,9%
КОМПОЗИЦИЯ 25	36,1/12,4/49/2,6	33,4%	12,1%	51,7%	2,8%
КОМПОЗИЦИЯ 26	34/17,5/46,1/2,4	30,4%	18,2%	48,9%	2,5%
КОМПОЗИЦИЯ 27	33/19,8/44,8/2,4	29,5%	19,9%	48,1%	2,5%
КОМПОЗИЦИЯ 28	43,8/18,8/35,6/1,9	43,6%	19,4%	35,3%	1,7%
КОМПОЗИЦИЯ 29	43,5/18,6/35,4/2,5	43,7%	18,8%	34,9%	2,6%
КОМПОЗИЦИЯ 30	43,2/18,5/35,2/3,1	42,8%	17,9%	36,3%	3,0%
КОМПОЗИЦИЯ 31	38,9/16,7/42,2/2,2	37,0%	16,4%	44,4%	2,3%
КОМПОЗИЦИЯ 32	38,7/16,6/42/2,8	37,4%	16,6%	43,4%	2,6%
КОМПОЗИЦИЯ 33	38,5/16,5/41,8/3,3	36,5%	16,0%	44,1%	3,5%
КОМПОЗИЦИЯ 34	32/13,7/52,1/2,3	30,0%	13,6%	54,0%	2,3%
КОМПОЗИЦИЯ 35	31,8/13,6/51,8/2,7	29,5%	13,6%	54,5%	2,4%
КОМПОЗИЦИЯ 36	31,7/13,6/51,6/3,2	29,4%	13,2%	54,2%	3,3%
КОМПОЗИЦИЯ 37	45,2/15,5/36,8/2,6	45,9%	15,5%	36,4%	2,2%
КОМПОЗИЦИЯ 38	40,1/13,8/43,6/2,6	40,2%	14,7%	42,5%	2,6%
КОМПОЗИЦИЯ 39	32,8/11,2/53,4/2,6	31,6%	11,4%	54,7%	2,3%
КОМПОЗИЦИЯ 40	38,5/27,7/31,3/2,5	37,8%	27,8%	31,6%	2,8%
КОМПОЗИЦИЯ 41	45/23,2/29,3/2,5	43,3%	24,3%	28,8%	3,6%
КОМПОЗИЦИЯ 42	39,1/20,1/38,3/2,5	39,6%	20,5%	36,9%	2,9%
КОМПОЗИЦИЯ 43	35/15/47,5/2,5	31,2%	15,5%	50,0%	3,4%
КОМПОЗИЦИЯ 44	35/15/47,5/2,5	32,1%	15,0%	50,6%	2,3%

Пример 1.5 Приготовление Т-клеток

Лейкаферез здорового человека-донора получали коммерческим путем (Немасаре). Т-клетки выделяли с помощью отрицательной селекции с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep Human T cell Isolation Kit (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% pen-strep (Gibco, 15140-122), дополненной 200 МЕ/мл IL2 (Peprotech, 200-02), 5 нг/мл IL7 (Peprotech, 200-07), 5 нг/мл IL15 (Peprotech, 200-15) и 2,5% сыворотки крови человека (Gemini, 100-512). После покоя в течение ночи Т-клетки с плотностью 10^6 клеток/мл активировали реагентом T cell TransAct Reagent (разведение 1:100, Miltenyi) и инкубировали при 37 °С 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 размораживания неактивированные Т-клетки культивировали в полной среде для роста CTS, состоящей из CTS OpTmizer Base Media (Thermofisher, A10485-01), 1% pen-strep (Corning, 30-002-CI) 1X GlutaMAX (Thermofisher, 35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, 15630080), к которым добавляли 200 Ед/мл IL2 (Peprotech, 200-02), 5 нг/мл IL7 (Peprotech, 200-07), 5 нг/мл IL15 (Peprotech, 200-15) с 5% сывороткой человека АВ (Gemini, 100-512) и инкубировали в течение 24 ч без активации. Т-клетки высевали при плотности клеток 10^6 /мл в 100 мкл базовой среды CTS OpTmizer, описанной выше, содержащей 2,5% сыворотки крови человека и цитокины для редактирования.

Пример 1.6 Трансфекция Т-клеток посредством LNP

Т-клетки трансфицировали LNP, приготовленными, как описано ранее в Примере 1. Материалы, применяемые для трансфекции LNP, указаны в Примере 1. Трансфекцию посредством LNP с учетом кривых «доза-ответ» (DRC) проводили на системе обработки жидкостей Hamilton Microlab STAR. Для работы с жидкостью было обеспечено следующее: (а) 4X желаемая максимальная доза LNP в верхнем ряду 96-луночного планшета с глубокими лунками, (b) АроЕЗ, разведенный в среде в концентрации 20 мкг/мл, (с) полная среда для выращивания Т-клеток, состоящая из базовой среды CTS OpTmizer, как описано ранее в Примере 1, и (d) 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 АроЕЗ. 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 АроЕЗ составляли 5 мкг/мл, а конечная плотность Т-клеток составляла $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Планшеты инкубировали при 37 °С с 5% CO₂ в течение 24 или 48 часов для активированных или неактивированных 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 LNP и экспрессию белка на поверхности оценивали с помощью проточной цитометрии.

Пример 1.8 Анализ методом проточной цитометрии

Альфа-цепь рецептора Т-клеток, кодируемая TRAC, необходима для сборки комплекса рецептор Т-клетки/CD3 и транслокации на поверхность клетки. Редактирование оценивали по увеличению процента CD3-отрицательных клеток после редактирования. Для анализа белков клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии Т-клетки ресуспендировали в 100 мкл смеси антител (1:100 PE-анти-CD3 человека [Biolegend, кат. номер 300441], 1:200 FITC против CD4 человека [Biolegend, кат. номер 300538], 1:200 APC против CD8a человека [Biolegend, кат. номер 301049], буфер FACS [PBS+2% FBS+2 mM EDTA]) и инкубировали в течение 30 минут при 4 °С. Т-клетки промывали, затем ресуспендировали в буфере FACS (PBS+2% FBS+2 mM EDTA). Впоследствии Т-клетки обрабатывали на приборе Cytotflex (Beckman Coulter). Анализ данных проводили с помощью программного пакета FlowJo (v.10.6.1 или v.10.7.1). Вкратце, Т-клетки калибровали по лимфоцитам, а затем по одиночным клеткам. Эти одиночные клетки калибровали по статусу CD4+/CD8+, из которых были выбраны клетки CD8+/CD3-. Процент клеток CD8+/CD3- оценивали количественно, чтобы определить процент популяции клеток, в которой отредактированный целевой локус привел к нокауту TCR. Для построения кривых «доза-ответ» для TCR KO с помощью программы Prism GraphPad (v.9.0) применяли модель линейной регрессии. Для каждой LNP рассчитывались полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) и максимальное процентное значение CD3- кривой.

Пример 1.9. Секвенирование нового поколения («NGS») и анализ эффективности редактирования.

Для количественного определения эффективности редактирования в целевом месте генома применяли секвенирование, позволяющее выявить наличие вставок и делеций, вносимых в результате редактирования генов. PCR-праймеры конструировались вокруг целевого сайта в пределах представляющего интерес гена (например, TRAC), и амплифицировалась представляющая интерес геномная область. Схема последовательности праймера была выполнена в соответствии со стандартом в данной области техники.

Дополнительную PCR проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химических компонентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Считывания выравнивали в отношении эталонного генома (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 («indel»).

Пример 2 - Скрининг композиции Соединения 6 в Т-клетках

2.1 Характеризация ионизируемого липида LNP в CD3-положительных Т-клетках

Для оценки эффективности редактирования Т-клетки обрабатывали композициями LNP с различным мольным процентом липидных компонентов, инкапсулирующих мРНК Cas9 и sgРНК, нацеленную на ген TRAC, и оценивали с помощью проточной цитометрии потерю поверхностных белков рецепторов Т-клеток.

LNP обычно готовили, как в Примере 1, с липидной композицией, указанной в Таблице 1, выраженной как молярное соотношение ионизируемого Соединения 6/DSPC/холестерин/PEG, соответственно. LNP доставляла мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID No. 4) и sgРНК (SEQ ID NO. 10), нацеленную на TRAC человека. Соотношение грузов sgРНК и мРНК Cas9 составляло 1:2 по массе.

Композиции LNP анализировали на предмет Z-среднего и среднечислового размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в Примере 1, и результаты приведены в Таблице 2. Липидный анализ продемонстрировал фактический моль% уровень липидов каждого компонента, как указано в Таблице 1.

Таблица 2. Анализ композиции LNP

ID LNP	Номинальное молярное соотношение	Инкапсуляция (%)	Z-средн. размер (нм)	PDI	Средне числ. размер (нм)	Соотношение N/P
КОМПОЗИЦИЯ 1 (Сравнение)	50/10/38,5 /1,5	99%	118	0,05	96	6
КОМПОЗИЦИЯ 2	50/5/43,5 /1,5	99%	111	0,04	90	6
КОМПОЗИЦИЯ 3	45/15/38,5/ 1,5	99%	120	0,02	101	6
КОМПОЗИЦИЯ 4	45/5/48,5 /1,5	99%	121	0,03	99	6
КОМПОЗИЦИЯ 5	40/10/48,5 /1,5	99%	143	0,04	122	6
КОМПОЗИЦИЯ 6	30/10/58,5/ 1,5	96%	277	0,08	238	6
КОМПОЗИЦИЯ 7	30/5/63,5/ 1,5	99%	173	0,05	150	6
КОМПОЗИЦИЯ 8	55/5/38,5/ 1,5	98%	119	0,03	99	6

КОМПОЗИЦИЯ 9	55/10/33,5/ 1,5	98%	111	0,03	91	6
КОМПОЗИЦИЯ 10	65/5/28,5/ 1,5	95%	177	0,04	155	6
КОМПОЗИЦИЯ 11 (Сравнение)	50/10/38,5/ 1,5	98%	109	0,05	88	5
КОМПОЗИЦИЯ 12 (Сравнение)	50/10/38,5/ 1,5	99%	115	0,02	97	7

LNP в Таблице 2 оценивали для определения влияния соотношений композиций LNP на эффективность редактирования CD3-положительных (CD3+) Т-клеток. Т-клетки от двух доноров (партия № W0106 и № W0186) получали и трансфицировали, как описано в Примере 1, для активированных Т-клеток и неактивированных Т-клеток соответственно. Через семь дней после трансфекции отредактированные Т-клетки собирали и фенотипировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 1.

Процент CD3-отрицательных (CD3-) Т-клеток измеряли после обработки концентрациями LNP 0,04 мкг/мл, 0,08 мкг/мл, 0,16 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,63 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл. Средний процент CD3-отрицательных Т-клеток, максимальный процент CD3-отрицательных значений и EC50 при каждой дозе LNP приведены в Таблице 3 и на Фиг. 1А для активированных Т-клеток, а также в Таблице 4 и на Фиг. 1В для неактивированных Т-клеток. Приблизительные значения отмечены тильдой, а значения, которые не удалось определить с помощью аналитического программного обеспечения, - символом «ND».

Таблица 3. Средний процент CD3-отрицательных клеток после обработки активированных Т-клеток указанными композициями LNP.

ID LNP	LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс. % CD3-	EC50
КОМПОЗИЦИЯ 1 (Сравнение)	50/10/38,5 /1,5	5	95,3	0,5	2	97,2	1,55
		2,5	81,7	0,8	2		
		1,25	31,8	3,1	2		
		0,63	5,8	0,6	2		
		0,31	1,4	0,0	2		
		0,16	0,6	0,0	2		
		0,08	0,4	0,0	2		
		0,04	0,3	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 2	50/5/43,5/	5	88,8	0,2	2	90,9	1,41

	1,5	2,5	77,8	0,7	2		
		1,25	37,4	1,6	2		
		0,63	8,2	0,8	2		
		0,31	2,9	0,7	2		
		0,16	0,6	0,0	2		
		0,08	0,3	0,0	2		
		0,04	0,3	0,0	2		
КОМПОЗИЦИЯ 3	45/15/38,5 /1,5	5	97,1	0,2	2	98,4	1,41
		2,5	87,6	0,8	2		
		1,25	38,6	0,6	2		
		0,63	6,6	0,7	2		
		0,31	1,3	0,2	2		
		0,16	0,4	0,1	2		
		0,08	0,3	0,1	2		
		0,04	0,2	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 4	45/5/48,5/ 1,5	5	90,2	1,1	2	92,7	1,42
		2,5	76,7	0,0	2		
		1,25	38,5	0,9	2		
		0,63	8,5	0,5	2		
		0,31	1,5	0,3	2		
		0,16	0,5	0,0	2		
		0,08	0,5	0,1	2		
		0,04	0,5	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 5	40/10/48,5 /1,5	5	94,0	1,7	2	95,2	0,93
		2,5	89,7	1,2	2		
		1,25	66,5	0,8	2		
		0,63	24,5	0,2	2		
		0,31	6,8	0,2	2		
		0,16	2,2	0,2	2		
		0,08	0,8	0,1	2		
		0,04	0,6	0,0	2		
КОМПОЗИЦИЯ 6	30/10/58,5 /1,5	5	4,7	0,2	2	10,5	6,43
		2,5	3,1	0,8	2		
		1,25	1,6	0,3	2		

		0,63	1,1	0,0	2		
		0,31	0,7	0,1	2		
		0,16	0,6	0,0	2		
		0,08	0,3	0,0	2		
		0,04	0,3	0,0	2		
КОМПОЗИЦІЯ 7	30/5/63,5/ 1,5	5	52,0	1,6	2	84,0	3,19
		2,5	34,3	2,7	2		
		1,25	26,0	0,4	2		
		0,63	15,6	0,2	2		
		0,31	7,3	0,4	2		
		0,16	2,9	0,2	2		
		0,08	1,3	0,1	2		
		0,04	0,4	0,1	2		
КОМПОЗИЦІЯ 8	55/5/38,5/ 1,5	5	67,0	2,0	2	80,2	2,68
		2,5	36,7	0,5	2		
		1,25	9,8	1,1	2		
		0,63	2,6	0,1	2		
		0,31	0,6	0,2	2		
		0,16	0,4	0,1	2		
		0,08	0,1	0,1	2		
		0,04	0,3	0,1	2		
КОМПОЗИЦІЯ 9	55/10/33,5 /1,5	5	89,2	0,6	2	92,7	2,30
		2,5	54,6	1,1	2		
		1,25	7,3	0,2	2		
		0,63	1,4	0,1	2		
		0,31	0,5	0,2	2		
		0,16	0,3	0,1	2		
		0,08	0,2	0,1	2		
		0,04	0,2	0,1	2		
КОМПОЗИЦІЯ 10	65/5/28,5/ 1,5	5	0,2	0,1	2	~0,26	~ 0,50
		2,5	0,2	0,0	2		
		1,25	0,3	0,0	2		
		0,63	0,4	0,1	2		
		0,31	0,2	0,0	2		

		0,16	0,1	0,1	2		
		0,08	0,3	0,0	2		
		0,04	0,3	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 11 (Сравнение)	50/10/38,5 /1,5 (N/P: 5,0)	5	95,6	0,1	2	98,4	1,17
		2,5	90,0	1,0	2		
		1,25	53,4	1,3	2		
		0,63	16,4	1,7	2		
		0,31	4,5	0,2	2		
		0,16	1,8	0,1	2		
		0,08	0,5	0,0	2		
		0,04	0,6	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 12 (Сравнение)	50/10/38,5 /1,5 (N/P: 7,0)	5	97,7	0,1	2	97,7	0,90
		2,5	93,5	0,2	2		
		1,25	73,0	0,9	2		
		0,63	24,0	0,2	2		
		0,31	5,5	0,1	2		
		0,16	1,5	0,5	2		
		0,08	0,9	0,3	2		
		0,04	0,6	0,1	2		

Таблица 4. Средний процент CD3-отрицательных клеток после обработки неактивированных Т-клеток указанными композициями LNP.

ID LNP	LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс. % CD3-	EC50
КОМПОЗИЦИЯ 1 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	5	69,7	0,9	2	68,8	1,21
		2,5	65,1	1,3	2		
		1,25	41,3	8,9	2		
		0,63	11,1	4,0	2		
		0,31	10,2	0,5	2		
		0,16	8,1	1,5	2		
		0,08	9,9	2,0	2		
		0,04	7,2	2,5	2		
КОМПОЗИЦИЯ 2	50/5/43,5/1,5	5	47,6	3,6	2	83,7	4,71
		2,5	30,0	5,0	2		

		1,25	20,1	2,9	2		
		0,63	11,4	2,3	2		
		0,31	9,8	1,3	2		
		0,16	9,1	0,0	2		
		0,08	9,3	0,8	2		
		0,04	7,9	3,6	2		
КОМПОЗИЦИЯ 3	45/15/38,5/1,5	5	83,1	1,5	2	86,2	1,36
		2,5	73,0	3,1	2		
		1,25	43,4	6,8	2		
		0,63	19,4	3,4	2		
		0,31	11,7	2,4	2		
		0,16	8,9	1,3	2		
		0,08	9,0	1,6	2		
		0,04	9,5	2,9	2		
КОМПОЗИЦИЯ 4	45/5/48,5/1,5	5	49,0	1,7	2	68,4	2,99
		2,5	33,7	6,3	2		
		1,25	25,8	2,3	2		
		0,63	14,7	1,0	2		
		0,31	9,8	0,7	2		
		0,16	11,2	3,9	2		
		0,08	10,2	1,9	2		
		0,04	9,5	2,5	2		
КОМПОЗИЦИЯ 5	40/10/48,5/1,5	5	60,5	3,2	2	60,8	0,66
		2,5	61,6	4,4	2		
		1,25	57,9	6,7	2		
		0,63	34,0	7,9	2		
		0,31	12,1	0,8	2		
		0,16	10,4	1,2	2		
		0,08	13,7	0,4	2		
		0,04	10,4	4,7	2		
КОМПОЗИЦИЯ 6	30/10/58,5/1,5	5	11,0	0,1	2	ND	ND
		2,5	11,3	2,9	2		
		1,25	8,0	0,5	2		
		0,63	11,3	0,5	2		

		0,31	10,3	0,7	2		
		0,16	9,3	1,3	2		
		0,08	10,8	0,8	2		
		0,04	10,7	5,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 7	30/5/63,5/1,5	5	26,7	1,0	2	33,4	0,37
		2,5	18,9	0,1	2		
		1,25	19,6	1,5	2		
		0,63	23,0	1,2	2		
		0,31	15,4	0,5	2		
		0,16	11,8	3,5	2		
		0,08	12,5	0,3	2		
		0,04	9,9	3,4	2		
КОМПОЗИЦИЯ 8	55/5/38,5/1,5	5	24,6	1,0	2	24,6	~2,5
		2,5	18,0	2,4	2		
		1,25	10,1	2,2	2		
		0,63	12,4	3,2	2		
		0,31	9,5	3,2	2		
		0,16	10,4	1,3	2		
		0,08	11,4	1,5	2		
		0,04	12,4	2,7	2		
КОМПОЗИЦИЯ 9	55/10/33,5/1,5	5	61,0	3,7	2	61,8	1,57
		2,5	53,6	6,5	2		
		1,25	26,5	7,3	2		
		0,63	12,4	2,4	2		
		0,31	13,1	5,7	2		
		0,16	9,9	2,9	2		
		0,08	10,4	1,5	2		
		0,04	10,1	3,0	2		
КОМПОЗИЦИЯ 10	65/5/28,5/1,5	5	14,7	0,8	2	~100	~6,052
		2,5	8,6	1,6	2		
		1,25	10,9	2,9	2		
		0,63	10,7	1,1	2		
		0,31	12,0	3,8	2		
		0,16	10,4	4,8	2		

		0,08	10,6	0,6	2		
		0,04	8,9	2,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 11 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5 (N/P: 5,0)	5	74,4	2,3	2	76,2	1,30
		2,5	69,6	7,9	2		
		1,25	40,5	7,2	2		
		0,63	19,5	0,3	2		
		0,31	8,9	3,2	2		
		0,16	9,3	1,1	2		
		0,08	9,9	0,2	2		
		0,04	14,3	14,3	2		
КОМПОЗИЦИЯ 12 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5 (N/P: 7,0)	5	76,0	0,5	2	73,3	0,76
		2,5	68,4	2,1	2		
		1,25	65,4	3,8	2		
		0,63	27,9	4,9	2		
		0,31	12,1	1,9	2		
		0,16	9,3	0,5	2		
		0,08	10,5	2,2	2		
		0,04	0,0	0,0	2		

Пример 3 - Скрининг композиций LNP из выбранного Соединения 6 в Т-клетках

3.1 Оценка выбранных композиций LNP в отредактированных CD3+ Т-клетках

Для оценки эффективности редактирования LNP Т-клетки обрабатывали композициями LNP, включающими Соединение 6 с различным молярным соотношением липидных компонентов, инкапсулирующих мРНК Cas9 и sgРНК, нацеленную на ген TRAC, и оценивали с помощью проточной цитометрии потерю поверхностных белков рецепторов Т-клеток.

LNP обычно готовили, как описано в Примере 1, с липидной композицией, указанной в Таблице 5, выраженной как молярное соотношение ионизируемого Соединения 6/ DSPC/холестерин/PEG, соответственно. LNP доставляла мРНК, кодирующую мРНК Cas9 (SEQ ID: 4) и sgРНК (SEQ ID NO. 10) нацеленную на человеческий TRAC. Соотношение грузов sgРНК и мРНК Cas9 составляло 1:2 по массе.

Композиции LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), общее содержание РНК и эффективность инкапсуляции РНК, как описано в Примере 1 и результаты представлены в Таблице 5. Анализ липидов продемонстрировал фактическое содержание липидов в моль%, как представлено в Таблице 1.

Таблица 5. Анализ композиции LNP

ID LNP	Номинальное	Инкапсу	Z-Средн.	PDI	Среднечи	Соотно
--------	-------------	---------	----------	-----	----------	--------

	молярное соотношение	ляция (%)	размер (нм)		сл. размер (нм)	шение N/P
КОМПОЗИЦИЯ 1 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	98%	113	0,03	102	6
КОМПОЗИЦИЯ 13	30/5/62,5/2,5	99%	108	0,08	92	6
КОМПОЗИЦИЯ 14	35/10/52,5/2,5	99%	84	0,06	67	6
КОМПОЗИЦИЯ 15	35/10/53,5/1,5	98%	218	0,05	206	6
КОМПОЗИЦИЯ 16	35/15/47,5/2,5	98%	78	0,03	72	6
КОМПОЗИЦИЯ 5	40/10/48,5/1,5	99%	162	0,09	142	6
КОМПОЗИЦИЯ 17	40/15/43,5/1,5	99%	124	0,02	113	6
КОМПОЗИЦИЯ 18	45/10/43,5/1,5	99%	121	0,06	107	6
КОМПОЗИЦИЯ 19	40/10/48,5/1,5	99%	156	0,06	147	7
КОМПОЗИЦИЯ 20	40/10/48,5/1,5	99%	146	0,08	126	9

T-клетки от двух доноров (партия № W0106 и № W790) готовили и трансфицировали, как описано в Примере 1. Через 6 дней после трансфекции отредактированные активированные и неактивированные T-клетки собирали и фенотипировали методом проточной цитометрии, как описано в Примере 1. Процент CD3-отрицательных T-клеток измеряли для T-клеток, обработанных LNP в концентрациях 0,04 мкг, 0,08 мкг, 0,16 мкг, 0,31 мкг, 0,63 мкг, 1,25 мкг, 2,5 мкг и 5 мкг. Средний процент CD3-отрицательных T-клеток, рассчитанное максимальное значение процента CD3 и EC50 при каждой дозе LNP представлены в Таблице 6 и на ФИГ. 2А для активированных T-клеток и в Таблице 7 и на ФИГ. 2В для неактивированных T-клеток.

Таблица 6. Процент CD3-отрицательных клеток после обработки активированных T-клеток LNP указанными композициями LNP

ID LNP	LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс.% CD3-	EC50
--------	-----	----------------------	-------------------	----	---	----------------	------

КОМПОЗИЦИЯ 1 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	5	96,2	0,3	2	98,3	0,91
		2,5	93,2	0,1	2		
		1,25	68,6	3,4	2		
		0,63	27,3	2,2	2		
		0,31	8,1	1,1	2		
		0,16	2,6	0,2	2		
		0,08	1,1	0,1	2		
		0,04	0,7	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 13	30/5/62,5/2,5	5	77,7	0,2	2	81,3	0,48
		2,5	77,7	0,4	2		
		1,25	71,1	2,0	2		
		0,63	48,1	0,8	2		
		0,31	29,0	0,7	2		
		0,16	16,2	0,3	2		
		0,08	7,4	0,3	2		
		0,04	3,5	0,5	2		
КОМПОЗИЦИЯ 14	35/10/52,5/2,5	5	95,3	0,2	2	96,6	0,26
		2,5	95,0	0,2	2		
		1,25	92,0	0,5	2		
		0,63	80,1	0,9	2		
		0,31	55,9	0,5	2		
		0,16	31,5	1,1	2		
		0,08	13,2	0,1	2		
		0,04	6,1	0,4	2		
КОМПОЗИЦИЯ 15	35/10/53,5/1,5	5	68,3	0,2	2	71,6	1,14
		2,5	59,2	0,9	2		
		1,25	39,4	1,2	2		
		0,63	16,9	1,5	2		
		0,31	5,2	0,2	2		
		0,16	2,1	0,2	2		
		0,08	0,8	0,1	2		
		0,04	0,5	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 16	35/15/47,5/2,5	5	97,9	0,4	2	98,6	0,20
		2,5	97,6	0,1	2		

		1,25	96,4	0,2	2		
		0,63	88,9	0,2	2		
		0,31	69,7	1,1	2		
		0,16	41,5	1,5	2		
		0,08	19,6	0,3	2		
		0,04	8,4	0,3	2		
КОМПОЗИЦИЯ 5	40/10/48,5/1,5	5	91,2	0,1	2	93,1	0,85
		2,5	86,7	1,6	2		
		1,25	66,6	0,4	2		
		0,63	31,2	1,2	2		
		0,31	10,1	0,5	2		
		0,16	3,9	0,0	2		
		0,08	1,6	0,3	2		
		0,04	0,8	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 17	40/15/43,5/1,5	5	93,7	0,6	2	95,0	0,88
		2,5	90,8	0,3	2		
		1,25	69,3	0,2	2		
		0,63	27,4	0,8	2		
		0,31	7,5	0,9	2		
		0,16	2,3	0,3	2		
		0,08	1,1	0,1	2		
		0,04	0,6	0,3	2		
КОМПОЗИЦИЯ 18	45/10/43,5/1,5	5	96,5	0,2	2	97,5	0,56
		2,5	94,9	0,6	2		
		1,25	86,1	1,0	2		
		0,63	56,1	1,6	2		
		0,31	21,3	1,3	2		
		0,16	7,4	0,5	2		
		0,08	3,0	0,4	2		
		0,04	1,4	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 19	40/10/48,5/1,5 (N/P: 7,0)	5	88,5	0,8	2	90,2	0,69
		2,5	85,0	1,2	2		
		1,25	70,8	1,6	2		
		0,63	40,9	0,5	2		

		0,31	15,4	0,5	2		
		0,16	5,4	0,3	2		
		0,08	2,1	0,1	2		
		0,04	0,8	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 20	40/10/48,5/1,5 (N/P: 9,0)	5	90,2	1,2	2	90,3	0,63
		2,5	85,8	0,6	2		
		1,25	75,2	1,1	2		
		0,63	46,0	1,6	2		
		0,31	16,1	0,9	2		
		0,16	4,7	0,3	2		
		0,08	2,3	0,2	2		
		0,04	1,1	0,1	2		

Таблица 7. Процент CD3-отрицательных клеток после обработки неактивированных Т-клеток указанными композициями LNP

ID LNP	LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс.% CD3-	EC50
КОМПОЗИЦИЯ 1 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	5	89,4	0,9	2	89	0,89
		2,5	86,1	2,0	2		
		1,25	70,7	2,5	2		
		0,63	27,5	2,9	2		
		0,31	12,8	1,4	2		
		0,16	7,9	1,1	2		
		0,08	10,1	0,5	2		
		0,04	9,7	2,4	2		
КОМПОЗИЦИЯ 13	30/5/62,5/2,5	5	46,5	1,7	2	56	0,27
		2,5	58,6	1,1	2		
		1,25	59,6	3,8	2		
		0,63	58,8	3,9	2		
		0,31	40,8	3,2	2		
		0,16	17,5	0,3	2		
		0,08	14,8	2,1	2		
		0,04	10,2	0,9	2		
КОМПОЗИЦИЯ 14	35/10/52,5/2,5	5	70,9	4,4	2	81	0,19
		2,5	80,7	0,6	2		

ID LNP	LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс.% CD3-	EC50
		1,25	88,1	1,5	2		
		0,63	82,8	1,6	2		
		0,31	67,6	4,1	2		
		0,16	37,3	0,5	2		
		0,08	23,3	0,0	2		
		0,04	12,5	0,4	2		
КОМПОЗИЦИЯ 15	35/10/53,5/1,5	5	40,6	0,4	2	41,1	1,00
		2,5	40,3	1,4	2		
		1,25	31,1	1,5	2		
		0,63	15,5	1,8	2		
		0,31	11,0	0,1	2		
		0,16	9,2	0,4	2		
		0,08	10,4	0,6	2		
		0,04	11,1	2,8	2		
КОМПОЗИЦИЯ 16	35/15/47,5/2,5	5	87,4	3,6	2	92	0,23
		2,5	91,5	1,0	2		
		1,25	94,3	0,5	2		
		0,63	89,3	1,5	2		
		0,31	64,8	0,3	2		
		0,16	38,5	1,0	2		
		0,08	23,6	1,6	2		
		0,04	14,9	0,9	2		
КОМПОЗИЦИЯ 5	40/10/48,5/1,5	5	66,8	0,2	2	70,2	1,04
		2,5	72,8	1,9	2		
		1,25	51,2	0,4	2		
		0,63	16,0	2,8	2		
		0,31	13,5	0,5	2		
		0,16	9,7	3,2	2		
		0,08	8,8	1,1	2		
		0,04	7,3	1,3	2		
КОМПОЗИЦИЯ 17	40/15/43,5/1,5	5	73,5	0,6	2	77,4	1,09
		2,5	78,1	0,6	2		

ID LNP	LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс.% CD3-	EC50
		1,25	49,3	0,2	2		
		0,63	20,0	0,7	2		
		0,31	13,0	1,0	2		
		0,16	7,5	0,6	2		
		0,08	7,5	1,5	2		
		0,04	10,7	1,8	2		
КОМПОЗИЦИЯ 18	45/10/43,5/1,5	5	82,4	2,2	2	84,8	0,74
		2,5	86,3	1,3	2		
		1,25	79,4	3,9	2		
		0,63	34,8	2,1	2		
		0,31	17,9	1,5	2		
		0,16	11,4	3,4	2		
		0,08	11,2	0,8	2		
		0,04	10,7	1,8	2		
КОМПОЗИЦИЯ 19	40/10/48,5/1,5 (N/P: 7,0)	5	51,9	1,5	2	62,2	0,55
		2,5	68,9	0,6	2		
		1,25	65,4	2,6	2		
		0,63	44,0	5,1	2		
		0,31	14,9	0,6	2		
		0,16	11,5	1,1	2		
		0,08	11,1	0,6	2		
		0,04	7,4	1,4	2		
КОМПОЗИЦИЯ 20	40/10/48,5/1,5 (N/P: 9,0)	5	59,0	2,9	2	66,3	0,52
		2,5	71,1	1,3	2		
		1,25	67,7	0,7	2		
		0,63	46,9	1,5	2		
		0,31	16,1	1,0	2		
		0,16	9,7	0,2	2		
		0,08	7,6	1,7	2		
		0,04	8,7	1,7	2		

Пример 4. Скрининг композиции Соединения б в Т-клетках

4.1 Характеризация ионизируемого липида LNP в CD3-положительных Т-клетках

Для оценки эффективности редактирования LNP Т-клетки обрабатывали композициями LNP с альтернативными молярными соотношениями липидных компонентов, инкапсулирующих mPНК Cas9 и sgPНК, нацеленную на ген TRAC, и оценивали с помощью проточной цитометрии потерю поверхностных белков рецепторов Т-клеток.

LNP обычно готовили, как в Примере 1, с липидной композицией, указанной в Таблице 8, выраженной как молярное соотношение ионизируемого Соединения 6/DSPC/холестерин/PEG, соответственно. LNP доставляла mPНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID No. 4) и sgPНК (SEQ ID NO. 10) нацеленную на человеческий TRAC. Соотношение грузов sgPНК и mPНК Cas9 составляло 1:2 или 1:1 по массе. Сравнительная КОМПОЗИЦИЯ 21 имела соотношение грузов 1:2, а остальные LNP имели соотношение грузов 1:1.

Композиции LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), общее содержание PНК и эффективность инкапсуляции PНК, как описано в Примере 1 и результаты представлены в Таблице 8. Анализ липидов продемонстрировал фактическое содержание липидов в моль%, как представлено в Таблице 1.

Таблица 8. Анализ композиции LNP

ID LNP	Номинальное молярное соотношение	Инкапсуляция (%)	Z-средн. размер (нм)	PDI	Среднечисл. размер (нм)	Соотношение N/P
КОМПОЗИЦИЯ 21 (Сравнение)	50/9/39,5/1,5	99%	124	0,03	113	6
КОМПОЗИЦИЯ 22 (Сравнение)	50/9/39,5/1,5	99%	114	0,01	108	6
КОМПОЗИЦИЯ 23	35/15/47,5/2,5	99%	76	0	70	6
КОМПОЗИЦИЯ 24	37,2/9,6/50,5/2,7	99%	69	0,03	61	6
КОМПОЗИЦИЯ 25	36,1/12,4/49/2,6	99%	69	0,04	60	6
КОМПОЗИЦИЯ 26	34/17,5/46,1/2,4	99%	70	0,02	62	6
КОМПОЗИЦИЯ 27	33/19,8/44,8/2,4	99%	74	0,04	66	6

КОМПОЗИЦИЯ 28	43,8/18,8/35,6/ 1,9	99%	86	0,01	80	6
КОМПОЗИЦИЯ 29	43,5/18,6/35,4/ /2,5	98%	75	0,04	69	6
КОМПОЗИЦИЯ 30	43,2/18,5/35,2/ 3,1	98%	70	0,01	66	6
КОМПОЗИЦИЯ 31	38,9/16,7/42,2/ 2,2	98%	75	0,03	68	6
КОМПОЗИЦИЯ 32	38,7/16,6/42/ 2,8	99%	71	0,04	62	6
КОМПОЗИЦИЯ 33	38,5/16,5/41,8/ 3,3	99%	61	0,03	56	6
КОМПОЗИЦИЯ 34	32/13,7/52,1/ 2,3	99%	83	0,05	73	6
КОМПОЗИЦИЯ 35	31,8/13,6/51,8/ 2,7	99%	73	0,03	65	6
КОМПОЗИЦИЯ 36	31,7/13,6/51,6/ 3,2	99%	63	0,04	54	6
КОМПОЗИЦИЯ 37	45,2/15,5/36,8/ 2,6	99%	81	0,02	74	6
КОМПОЗИЦИЯ 38	40,1/13,8/43,6/ 2,6	99%	71	0,05	62	6
КОМПОЗИЦИЯ 39	32,8/11,2/53,4/ 2,6	99%	83	0,04	73	6
КОМПОЗИЦИЯ 40	38,5/27,7/31,3/ 2,5	98%	68	0,02	60	6
КОМПОЗИЦИЯ 41	45/23,2/29,3/ 2,5	96%	67	0,02	62	6
КОМПОЗИЦИЯ 42	39,1/20,1/38,3/ 2,5	98%	66	0,01	61	6
КОМПОЗИЦИЯ 43	35/15/47,5/2,5	98%	57	0,06	46	5
КОМПОЗИЦИЯ 44	35/15/47,5/2,5	99%	78	0,01	71	7

T-клетки от одного донора (W0106) готовили, активировали и трансфецировали, как описано в Примере 1. Через семь дней после трансфекции отредактированные активированные и неактивированные T-клетки собирали и фенотипировали методом проточной цитометрии, как описано в Примере 1.

Процент CD3-отрицательных T-клеток измеряли после обработки LNP в концентрациях 0,04 мкг, 0,08 мкг, 0,16 мкг, 0,25 мкг, 0,63 мкг, 1,25 мкг, 2,5 мкг и 5 мкг. Среднее значение процента CD3-отрицательных T-клеток, максимальное значение процента CD3 и EC50 при каждой дозе LNP приведены в Таблицах 9 и 10.

Таблица 9. Средний процент CD3-отрицательных клеток после обработки неактивированных T-клеток указанными композициями LNP

ID LNP	LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс.% CD3-	EC50
КОМПОЗИЦИЯ 21 (Сравнение)	50/9/39,5/1,5	5	97,3	0,0	2	98,2	0,86
		2,5	94,9	1,1	2		
		1,25	75,0	1,3	2		
		0,63	28,8	0,7	2		
		0,31	8,2	0,5	2		
		0,16	3,7	0,1	2		
		0,08	2,0	0,1	2		
		0,04	1,7	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 22 (Сравнение)	50/9/39,5/1,5	5	97,9	0,1	2	99,1	0,85
		2,5	96,4	0,3	2		
		1,25	77,2	0,1	2		
		0,63	29,1	0,5	2		
		0,31	10,3	0,5	2		
		0,16	4,6	0,5	2		
		0,08	2,5	0,2	2		
		0,04	1,2	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 23	35/15/47,5/2,5	5	99,5	0,1	2	100	0,15
		2,5	99,1	0,2	2		
		1,25	99,1	0,0	2		
		0,63	96,7	0,4	2		
		0,31	83,9	0,4	2		

		0,16	55,1	0,4	2		
		0,08	28,7	0,6	2		
		0,04	11,7	0,4	2		
КОМПОЗИЦИЯ 24	37,2/9,6/50,5/ 2,7	5	98,1	0,2	2	98,8	0,37
		2,5	97,6	0,1	2		
		1,25	94,7	0,1	2		
		0,63	78,6	0,6	2		
		0,31	40,5	0,6	2		
		0,16	16,0	1,0	2		
		0,08	5,9	0,5	2		
		0,04	3,0	0,7	2		
КОМПОЗИЦИЯ 25	36,1/12,4/49/ 2,6	5	98,7	0,1	2	99,8	0,25
		2,5	98,8	0,3	2		
		1,25	97,5	0,2	2		
		0,63	88,7	0,1	2		
		0,31	62,4	1,4	2		
		0,16	32,3	0,6	2		
		0,08	14,4	1,1	2		
		0,04	6,3	1,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 26	34/17,5/46,1/ 2,4	5	99,3	0,1	2	100	0,14
		2,5	99,2	0,1	2		
		1,25	99,1	0,1	2		
		0,63	96,3	0,0	2		
		0,31	82,6	0,1	2		
		0,16	57,2	0,6	2		
		0,08	30,6	0,3	2		
		0,04	13,0	1,0	2		
КОМПОЗИЦИЯ 27	33/19,8/44,8/ 2,4	5	99,5	0,1	2	100	0,14
		2,5	99,5	0,1	2		
		1,25	99,2	0,2	2		
		0,63	96,4	0,4	2		
		0,31	83,3	0,6	2		
		0,16	58,2	0,1	2		
		0,08	29,9	1,2	2		

		0,04	13,0	0,7	2		
КОМПОЗИЦИЯ 28	43,8/18,8/35,6 /1,9	5	99,4	0,0	2	100	0,79
		2,5	98,3	0,0	2		
		1,25	82,0	0,1	2		
		0,63	33,5	0,1	2		
		0,31	6,8	0,4	2		
		0,16	2,5	0,8	2		
		0,08	1,6	0,5	2		
		0,04	1,9	0,9	2		
КОМПОЗИЦИЯ 29	43,5/18,6/35,4 /2,5	5	99,6	0,0	2	100	0,39
		2,5	99,5	0,1	2		
		1,25	97,7	0,2	2		
		0,63	80,9	0,9	2		
		0,31	35,9	2,1	2		
		0,16	9,2	0,3	2		
		0,08	3,4	0,4	2		
		0,04	2,1	0,8	2		
КОМПОЗИЦИЯ 30	43,2/18,5/35,2 /3,1	5	99,5	0,1	2	100	0,31
		2,5	99,6	0,1	2		
		1,25	99,1	0,3	2		
		0,63	90,7	0,8	2		
		0,31	50,7	4,4	2		
		0,16	16,9	1,2	2		
		0,08	6,3	0,1	2		
		0,04	2,2	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 31	38,9/16,7/42,2 /2,2	5	99,5	0,1	2	100	0,18
		2,5	99,5	0,1	2		
		1,25	99,2	0,1	2		
		0,63	96,6	0,1	2		
		0,31	78,5	0,7	2		
		0,16	46,5	0,0	2		
		0,08	22,3	0,5	2		
		0,04	9,6	0,7	2		
КОМПОЗИЦИЯ	38,7/16,6/42/	5	99,5	0,1	2	100	0,17

32	2,8	2,5	99,5	0,0	2		
		1,25	99,4	0,1	2		
		0,63	97,0	0,1	2		
		0,31	79,2	0,9	2		
		0,16	48,6	0,5	2		
		0,08	22,2	0,1	2		
		0,04	9,4	0,7	2		
КОМПОЗИЦИЯ 33	38,5/16,5/41,8 /3,3	5	98,5	0,0	2	99,1	0,31
		2,5	98,6	0,1	2		
		1,25	97,4	0,3	2		
		0,63	89,5	0,4	2		
		0,31	50,7	0,7	2		
		0,16	17,1	0,2	2		
		0,08	5,6	0,3	2		
		0,04	2,6	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 34	32/13,7/52, 1/2,3	5	98,8	0,1	2	99,2	0,15
		2,5	98,2	0,1	2		
		1,25	98,3	0,2	2		
		0,63	96,1	0,2	2		
		0,31	82,6	0,6	2		
		0,16	55,8	1,3	2		
		0,08	28,7	0,9	2		
		0,04	13,6	0,6	2		
КОМПОЗИЦИЯ 35	31,8/13,6/51,8 /2,7	5	98,2	0,3	2	98,6	0,14
		2,5	97,5	0,1	2		
		1,25	97,3	0,2	2		
		0,63	95,3	0,0	2		
		0,31	82,3	0,8	2		
		0,16	57,2	0,6	2		
		0,08	30,5	0,3	2		
		0,04	14,0	0,3	2		
КОМПОЗИЦИЯ 36	31,7/13,6/51,6 /3,2	5	93,8	0,0	2	93,4	0,20
		2,5	91,2	0,4	2		
		1,25	91,5	0,1	2		

		0,63	86,4	0,1	2		
		0,31	66,8	0,5	2		
		0,16	38,9	0,2	2		
		0,08	17,8	0,2	2		
		0,04	7,2	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 37	45,2/15,5/36,8 /2,6	5	99,3	0,1	2	99,9	0,34
		2,5	99,2	0,2	2		
		1,25	98,3	0,1	2		
		0,63	83,9	0,4	2		
		0,31	44,5	2,3	2		
		0,16	13,0	1,1	2		
		0,08	3,9	0,1	2		
		0,04	1,9	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯЗ 8	40,1/13,8/ 43,6/2,6	5	99,1	0,0	2	99,8	0,20
		2,5	99,2	0,0	2		
		1,25	98,8	0,2	2		
		0,63	95,3	0,2	2		
		0,31	74,6	0,7	2		
		0,16	39,1	0,4	2		
		0,08	15,5	1,2	2		
		0,04	5,7	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 39	32,8/11,2/53,4 /2,6	5	98,6	0,1	2	98,8	0,17
		2,5	97,7	0,4	2		
		1,25	97,3	0,2	2		
		0,63	94,3	0,0	2		
		0,31	76,9	0,6	2		
		0,16	48,8	0,5	2		
		0,08	22,1	0,1	2		
		0,04	10,1	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 40	38,5/27,7/31,3 /2,5	5	98,4	0,0	2	99,8	0,24
		2,5	98,4	0,2	2		
		1,25	96,1	0,4	2		
		0,63	84,5	1,4	2		
		0,31	61,2	2,7	2		

		0,16	32,9	2,7	2		
		0,08	14,5	0,9	2		
		0,04	5,0	0,6	2		
КОМПОЗИЦИЯ 41	45/23,2/29,3/ 2,5	5	98,4	0,1	2	100	0,30
		2,5	98,3	0,0	2		
		1,25	96,7	0,2	2		
		0,63	82,4	1,0	2		
		0,31	52,8	2,3	2		
		0,16	25,8	1,6	2		
		0,08	9,4	0,3	2		
		0,04	3,5	0,5	2		
КОМПОЗИЦИЯ 42	39,1/20,1/38,3 /2,5	5	99,4	0,1	2	11,0	0,19
		2,5	99,1	0,1	2		
		1,25	99,0	0,1	2		
		0,63	95,3	0,3	2		
		0,31	74,9	1,0	2		
		0,16	41,2	1,6	2		
		0,08	13,6	2,2	2		
		0,04	4,3	0,4	2		
КОМПОЗИЦИЯ 43	35/15/47,5/2,5 (N/P: 5,0)	5	88,5	0,3	2	90,1	0,57
		2,5	88,4	0,5	2		
		1,25	80,4	1,0	2		
		0,63	50,6	0,5	2		
		0,31	19,0	1,2	2		
		0,16	5,5	0,5	2		
		0,08	2,5	0,1	2		
		0,04	1,3	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 44	35/15/47,5/2,5 (N/P: 7,0)	5	98,7	0,0	2	99,5	0,15
		2,5	98,8	0,1	2		
		1,25	98,8	0,0	2		
		0,63	96,1	0,2	2		
		0,31	82,3	0,7	2		
		0,16	56,0	0,0	2		
		0,08	28,5	2,0	2		

		0,04	13,5	1,1	2		
--	--	------	------	-----	---	--	--

Таблица 10. Средний процент CD3-отрицательных клеток после обработки неактивированных Т-клеток указанными композициями LNP.

ID LNP	LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс.% CD3-	EC50
КОМПОЗИЦИЯ 21 (Сравнение)	50/9/39,5/1,5	5	78,9	3,2	2	76,0	0,68
		2,5	69,4	8,5	2		
		1,25	65,5	4,7	2		
		0,63	35,3	9,1	2		
		0,31	9,8	2,4	2		
		0,16	6,7	3,7	2		
		0,08	1,9	0,1	2		
		0,04	2,3	0,7	2		
КОМПОЗИЦИЯ 22 (Сравнение)	50/9/39,5/1,5	5	80,7	3,5	2	80,4	0,68
		2,5	76,2	3,6	2		
		1,25	69,5	2,6	2		
		0,63	36,5	13,9	2		
		0,31	13,9	1,2	2		
		0,16	3,6	0,9	2		
		0,08	4,6	1,2	2		
		0,04	2,7	0,4	2		
КОМПОЗИЦИЯ 23	35/15/47,5/2,5	5	85,8	5,4	2	88,3	0,09
		2,5	88,2	0,1	2		
		1,25	86,5	0,5	2		
		0,63	91,4	0,1	2		
		0,31	88,6	4,2	2		
		0,16	78,3	5,4	2		
		0,08	47,3	13,0	2		
		0,04	24,4	2,8	2		
КОМПОЗИЦИЯ 24	37,2/9,6/50,5/2,7	5	80,3	3,9	2	77,8	0,25
		2,5	79,9	1,2	2		
		1,25	61,4	21,5	2		
		0,63	78,8	4,0	2		

		0,31	41,6	1,0	2		
		0,16	30,6	7,3	2		
		0,08	8,0	2,7	2		
		0,04	6,3	4,6	2		
КОМПОЗИЦ ИЯ 25	36,1/12,4/49/2,6	5	81,4	2,9	2	82,2	0,13
		2,5	76,2	8,9	2		
		1,25	81,8	5,5	2		
		0,63	87,9	1,5	2		
		0,31	79,1	0,5	2		
		0,16	56,2	12,4	2		
		0,08	25,3	10,4	2		
		0,04	10,2	2,7	2		
КОМПОЗИЦ ИЯ 26	34/17,5/46,1/2,4	5	85,1	2,7	2	88,7	0,12
		2,5	90,1	1,4	2		
		1,25	85,1	3,4	2		
		0,63	92,0	1,8	2		
		0,31	89,8	2,2	2		
		0,16	71,2	3,4	2		
		0,08	44,9	3,0	2		
		0,04	33,1	4,9	2		
КОМПОЗИЦ ИЯ 27	33/19,8/44,8/2,4	5	93,5	0,0	2	90,0	0,05
		2,5	91,1	0,7	2		
		1,25	90,7	3,8	2		
		0,63	87,3	3,3	2		
		0,31	83,5	5,6	2		
		0,16	87,0	3,0	2		
		0,08	65,6	4,9	2		
		0,04	29,9	8,9	2		
КОМПОЗИЦ ИЯ 28	43,8/18,8/35,6/1,9	5	92,7	2,8	2	91,4	0,29
		2,5	89,4	2,0	2		
		1,25	91,1	0,4	2		
		0,63	69,4	4,4	2		
		0,31	55,2	0,7	2		
		0,16	12,9	0,6	2		

		0,08	5,6	0,4	2		
		0,04	2,3	0,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 29	43,5/18,6/35,4/2,5	5	80,3	7,1	2	88,1	0,10
		2,5	89,8	1,8	2		
		1,25	88,3	1,8	2		
		0,63	91,5	1,8	2		
		0,31	61,0	23,2	2		
		0,16	62,8	11,2	2		
		0,08	37,7	1,4	2		
		0,04	20,2	11,3	2		
КОМПОЗИЦИЯ 30	43,2/18,5/35,2/3,1	5	83,7	8,5	2	86,6	0,12
		2,5	82,7	8,9	2		
		1,25	93,2	2,0	2		
		0,63	87,3	6,5	2		
		0,31	79,3	2,3	2		
		0,16	68,8	1,8	2		
		0,08	44,8	1,0	2		
		0,04	34,1	1,7	2		
КОМПОЗИЦИЯ 31	38,9/16,7/42,2/2,2	5	91,3	2,2	2	91,9	0,10
		2,5	91,0	3,1	2		
		1,25	94,0	0,7	2		
		0,63	89,1	1,2	2		
		0,31	91,0	1,1	2		
		0,16	74,8	4,2	2		
		0,08	47,3	2,8	2		
		0,04	28,0	5,6	2		
КОМПОЗИЦИЯ 32	38,7/16,6/42/2,8	5	90,1	2,3	2	88,4	0,12
		2,5	92,2	1,8	2		
		1,25	87,9	5,9	2		
		0,63	82,7	7,6	2		
		0,31	89,0	1,4	2		
		0,16	80,2	2,8	2		
		0,08	47,8	8,7	2		
		0,04	44,6	1,9	2		

КОМПОЗИЦИЯ 33	38,5/16,5/41,8/3,3	5	78,5	6,7	2	83,2	0,13
		2,5	84,9	2,0	2		
		1,25	79,7	7,9	2		
		0,63	78,0	9,2	2		
		0,31	57,6	0,1	2		
		0,16	46,4	3,0	2		
		0,08	37,1	3,3	2		
		0,04	8,1	0,2	2		
КОМПОЗИЦИЯ 34	32/13,7/52,1/2,3	5	89,7	1,1	2	86,3	0,09
		2,5	83,6	6,9	2		
		1,25	78,5	1,3	2		
		0,63	90,3	1,6	2		
		0,31	89,5	0,2	2		
		0,16	79,6	0,9	2		
		0,08	52,0	12,0	2		
		0,04	31,6	2,6	2		
КОМПОЗИЦИЯ 35	31,8/13,6/51,8/2,7	5	78,7	2,4	2	82,0	0,09
		2,5	81,3	4,4	2		
		1,25	76,0	9,9	2		
		0,63	88,2	0,7	2		
		0,31	86,1	3,4	2		
		0,16	76,2	2,0	2		
		0,08	53,0	6,2	2		
		0,04	37,6	4,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 36	31,7/13,6/51,6/3,2	5	61,0	2,0	2	62,0	0,13
		2,5	53,4	8,8	2		
		1,25	61,3	7,8	2		
		0,63	64,8	9,6	2		
		0,31	69,6	2,1	2		
		0,16	52,1	3,9	2		
		0,08	27,1	9,8	2		
		0,04	23,3	3,0	2		
КОМПОЗИЦИЯ 37	45,2/15,5/36,8/2,6	5	95,6	1,5	2	92,3	0,12
		2,5	93,1	1,0	2		

		1,25	90,0	3,3	2		
		0,63	86,5	5,5	2		
		0,31	82,3	5,6	2		
		0,16	59,2	7,1	2		
		0,08	23,4	3,1	2		
		0,04	6,3	2,3	2		
КОМПОЗИЦ ИЯ 38	40,1/13,8/43,6/2,6	5	92,7	1,0	2	92,1	0,14
		2,5	94,0	0,2	2		
		1,25	87,3	5,7	2		
		0,63	91,4	1,3	2		
		0,31	80,4	0,4	2		
		0,16	61,2	2,0	2		
		0,08	35,9	7,2	2		
		0,04	24,4	3,7	2		
КОМПОЗИЦ ИЯ 39	32,8/11,2/53,4/2,6	5	86,3	1,4	2	84,4	0,10
		2,5	83,6	1,8	2		
		1,25	81,4	0,1	2		
		0,63	86,9	2,2	2		
		0,31	83,4	2,1	2		
		0,16	77,5	10,9	2		
		0,08	40,5	0,8	2		
		0,04	22,1	5,0	2		
КОМПОЗИЦ ИЯ 40	38,5/27,7/31,3/2,5	5	76,5	6,0	2	81,0	0,19
		2,5	78,7	3,3	2		
		1,25	84,4	3,5	2		
		0,63	80,0	6,2	2		
		0,31	70,0	0,2	2		
		0,16	45,7	4,4	2		
		0,08	51,1	5,3	2		
		0,04	28,7	2,7	2		
КОМПОЗИЦ ИЯ 41	45/23,2/29,3/2,5	5	81,7	7,5	2	84,1	0,18
		2,5	84,3	5,6	2		
		1,25	83,1	3,2	2		
		0,63	84,2	2,0	2		

		0,31	70,4	4,5	2		
		0,16	52,6	0,1	2		
		0,08	41,4	11,7	2		
		0,04	31,5	2,9	2		
КОМПОЗИЦИЯ 42	39,1/20,1/38,3/2,5	5	91,6	2,5	2	91,6	0,15
		2,5	91,1	1,1	2		
		1,25	91,0	0,3	2		
		0,63	90,3	2,8	2		
		0,31	86,1	2,1	2		
		0,16	63,5	3,5	2		
		0,08	42,3	6,1	2		
		0,04	31,9	4,8	2		
КОМПОЗИЦИЯ 43	35/15/47,5/2,5 (N/P: 5,0)	5	38,9	12,7	2	46,2	0,41
		2,5	43,3	5,0	2		
		1,25	58,1	3,5	2		
		0,63	34,0	2,5	2		
		0,31	20,7	7,4	2		
		0,16	11,5	4,5	2		
		0,08	12,4	4,0	2		
		0,04	3,6	1,1	2		
КОМПОЗИЦИЯ 44	35/15/47,5/2,5 (N/P: 7,0)	5	90,6	0,2	2	90,1	0,08
		2,5	91,2	0,2	2		
		1,25	89,9	1,6	2		
		0,63	91,7	1,2	2		
		0,31	85,7	6,8	2		
		0,16	87,2	1,7	2		
		0,08	66,2	2,5	2		
		0,04	45,4	9,6	2		

Как видно из Таблиц 9 и 10, LNP с меньшим количеством ионизируемого липида, большим количеством DSPC, холестерина и PEG-липидов имели неожиданно благоприятное значение EC50 по сравнению со композициями сравнения.

Пример 5 - Скрининг ионизируемого липида в Т-клетках

5.1 Характеризация композиций LNP с различными ионизируемыми липидами

Для оценки влияния других ионизируемых липидов в составе LNP на редактирование Т-клетки обрабатывали композициями LNP, содержащими одно из 3

ионизируемых липидных соединений при двух различных соотношениях компонентов. LNP готовили, как описано в Примере 1, с применением липидных композиций, указанных в Таблице 11, выраженных в виде молярного соотношения ионизируемого липидного соединения/DSPC/холестерина/PEG, соответственно. Каждое из Соединение 6, Соединение 8 и Соединение 11 были составляли в LNP, имеющих номинальное моль% соотношение липидных компонентов: 35% ионизируемого липида, 15% DSPC, 47,5% холестерина и 2,5% PEG-2k-DMG, и в сравнительных LNP с номинальным моль% соотношением липидных компонентов: 50% ионизируемого липида, 10% DSPC, 38,5% холестерина и 1,5% PEG-2k-DMG. LNP инкапсулировали мРНК Cas9 и sgРНК, нацеленную на ген TRAC, и редактирование оценивали с помощью проточной цитометрии по потере поверхностных белков рецепторов Т-клеток.

LNP доставляла мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID No. 5) и sgРНК нацеленную и sgРНК (SEQ ID NO. 10) нацеленную на человеческий TRAC. Соотношение грузов sgРНК и мРНК Cas9 для исследуемых LNP составляло 1:1 по массе.

Композиции LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), общее содержание РНК и эффективность инкапсуляции РНК, как описано в Примере 1 и результаты представлены в Таблице 11. Анализ липидов продемонстрировал фактическое содержание липидов в моль%, как представлено в Таблице 1.

Таблица 11. Анализ композиции LNP

ID LNP	Соединение	Номинальное молярное соотношение	Инкапсуляция (%)	Z-средн. размер (нм)	PDI	Средн. ечисл. размер (нм)	Соотношение N/P
КОМПОЗИЦИЯ 45 (Сравнение)	6	50/10/38,5/1,5	99%	111	0,06	99	6
КОМПОЗИЦИЯ 46 (Сравнение)	11	50/10/38,5/1,5	97%	110	0,02	99	6
КОМПОЗИЦИЯ 47 (Сравнение)	8	50/10/38,5/1,5	99%	94	0,02	86	6
КОМПОЗИЦИЯ 23	6	35/15/47,5/2,5	99%	73	0,03	63	6
КОМПОЗИЦИЯ 48	11	35/15/47,5/2,5	99%	71	0,03	64	6
КОМПОЗИЦИЯ	8	35/15/47,5/2,5	99%	63	0,04	55	6

ИЯ 49							
-------	--	--	--	--	--	--	--

Т-клетки от одного донора (W0106) готовили, активировали и трансфецировали, как описано в Примере 1, за исключением того, что неактивированные Т-клетки перед трансфекцией находились в состоянии покоя в течение 48 часов. Через семь дней после трансфекции отредактированные активированные Т-клетки собирали и фенотипировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 1.

Процент CD3-отрицательных Т-клеток измеряли после обработки концентрациями LNP 0,04 мкг, 0,08 мкг, 0,16 мкг, 0,25 мкг, 0,63 мкг, 1,25 мкг, 2,5 мкг и 5 мкг. Среднее значение процента CD3-отрицательных Т-клеток, максимальное значение процента CD3 и EC50 при каждой дозе LNP приведены в Таблице 12 и ФИГ. 3А для активированных Т-клеток и в Таблице 13 и на ФИГ. 3В для неактивированных Т-клеток.

Таблица 12. Процент CD3-отрицательных клеток после обработки активированных Т-клеток LNP, содержащими различные ионизируемые липиды

LNP	ID LNP	LNP (мкг)	Средний % CD3-	SD	N	Макс.% CD3-	EC50
50/10/38/1,5 (Сравнение)	КОМПОЗИЦИЯ 45	5	96,8	0,2	2	98,3	0,56
		2,5	94,9	0,2	2		
		1,25	86,9	0,1	2		
		0,63	55,1	1,6	2		
		0,31	23,8	0,3	2		
		0,16	8,6	0,2	2		
		0,08	3,3	0,5	2		
		0,04	1,9	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 46	5	5	93,9	0,1	98,7	0,81
		2,5	2,5	89,5	0,2		
		1,25	1,25	68,8	2,2		
		0,63	0,63	38,7	0,6		
		0,31	0,31	18,4	0,5		
		0,16	0,16	9,2	0,5		
		0,08	0,08	3,9	0,1		
		0,04	0,04	2,2	0,2		
	КОМПОЗИЦИЯ 47	5	97,9	0,0	2	100	0,42
		2,5	96,4	0,4	2		
		1,25	89,6	1,3	2		
		0,63	65,1	1,6	2		

		0,31	39,8	2,4	2		
		0,16	18,3	1,0	2		
		0,08	7,3	0,8	2		
		0,04	2,3	0,4	2		
35/15/47,5/2,5	КОМПОЗИЦИЯ 23	5	99,1	0,1	2	99,4	0,13
		2,5	98,2	0,0	2		
		1,25	97,8	0,5	2		
		0,63	95,2	1,3	2		
		0,31	84,1	1,9	2		
		0,16	61,7	1,0	2		
		0,08	37,6	0,5	2		
		0,04	18,6	0,4	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 48	5	97,9	0,1	2	98,71	0,19
		2,5	98,0	0,2	2		
		1,25	97,9	0,1	2		
		0,63	94,0	0,8	2		
		0,31	75,5	2,0	2		
		0,16	44,8	1,0	2		
		0,08	20,5	1,4	2		
		0,04	10,1	0,7	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 49	5	98,1	0,0	2	98,6	0,16
		2,5	97,1	0,3	2		
		1,25	96,6	0,1	2		
		0,63	93,1	0,6	2		
		0,31	76,8	0,8	2		
		0,16	52,6	0,4	2		
		0,08	29,6	0,1	2		
		0,04	14,4	1,5	2		

Таблица 13. Процент CD3-отрицательных клеток после обработки неактивированных Т-клеток LNP, содержащими различные ионизируемые липиды

LNP	ID LNP	Доза LNP (мкг/мл)	Средний % CD3-	SD	N	Макс.% CD3-	EC50
50/10/38/1,5	КОМПОЗИЦ	5	83,5	1,3	2	85	0,42

(Сравнение)	ИЯ 45	2,5	86,7	0,4	2					
		1,25	83,5	1,9	2					
		0,63	72,0	3,3	2					
		0,31	22,3	6,5	2					
		0,16	6,7	0,3	2					
		0,08	2,9	0,2	2					
		0,04	1,7	0,1	2					
	КОМПОЗИЦ ИЯ 46	5	68,5	0,1	2			71,9	0,83	
		2,5	74,8	3,9	2					
		1,25	58,4	3,1	2					
		0,63	25,9	4,5	2					
		0,31	9,3	2,3	2					
		0,16	2,7	0,1	2					
		0,08	6,7	2,4	2					
	0,04	11,9	8,1	2						
	КОМПОЗИЦ ИЯ 47	5	89,7	0,6	2			93,1	0,50	
		2,5	83,2	4,6	2					
		1,25	75,0	0,7	2					
		0,63	55,1	0,9	2					
		0,31	35,5	11,5	2					
		0,16	17,8	7,5	2					
		0,08	16,8	1,8	2					
	0,04	4,7	0,3	2						
	35/15/47,5/2,5	КОМПОЗИЦ ИЯ 23	5	95,5	0,4			2	92,9	0,05
			2,5	91,3	2,2			2		
			1,25	90,3	1,5			2		
			0,63	89,6	0,8			2		
			0,31	89,3	0,1			2		
0,16			83,8	1,1	2					
0,08			74,1	7,8	2					
0,04		64,9	6,1	2						
КОМПОЗИЦ ИЯ 48		5	93,0	3,0	2	92,8	0,12			
		2,5	93,3	0,7	2					
		1,25	91,7	1,0	2					

			(нм)				
КОМПОЗИЦИЯ 50 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	99%	113	0,0 2	95	0,07	6
КОМПОЗИЦИЯ 51 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	99%	112	0,0 3	92	0,07	6
КОМПОЗИЦИЯ 52 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	99%	110	0,0 6	86	0,07	6
КОМПОЗИЦИЯ 53 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	99%	110	0,0 1	91	0,07	6
КОМПОЗИЦИЯ 54	35/15/47,5/2,5	99%	83	0,0 2	67	0,07	6
КОМПОЗИЦИЯ 55	35/15/47,5/2,5	99%	80	0,0 3	65	0,07	6
КОМПОЗИЦИЯ 56	35/15/47,5/2,5	98%	77	0,0 4	61	0,07	6
КОМПОЗИЦИЯ 57	35/15/47,5/2,5	99%	75	0,0 3	60	0,07	6

Т-клетки собирали от одного донора (партия № W0106), готовили и трансфицировали, как описано в Примере 1. Через семь дней после трансфекции Т-клетки фенотипировали методом проточной цитометрии, как описано в Примере 1. Процент CD3-отрицательных Т-клеток определяли после обработки LNP в концентрациях 0,04 мкг, 0,08 мкг, 0,16 мкг, 0,25 мкг, 0,63 мкг, 1,25 мкг, 2,5 мкг и 5 мкг. Среднее значение процента CD3-отрицательных Т-клеток, максимальное значение процента CD3 и EC50 при каждой дозе LNP приведены в Таблице 15 и Фиг. 4А.

Таблица 15. Процент отрицательных CD3-клеток после обработки активированных Т-клеток LNP с различным соотношением грузов

LNP	ID LNP	Соотношение грузов	LNP (мкг)	Средний % CD3-	SD	N	Мак с.% CD3	EC50
50/10/38/1,5	КОМПОЗИ	1:2	5	95,4	0,6	2	95,9	0,98

LNP	ID LNP	Соотношение грузов	LNP (мкг)	Средний % CD3-	SD	N	Мак с.% CD3	EC50
(Сравнение)	ЦИА 50		2,5	93,0	0,9	2		
			1,25	68,4	2,9	2		
			0,63	17,1	2,2	2		
			0,31	4,7	0,6	2		
			0,16	1,3	0,1	2		
			0,08	0,9	0,0	2		
			0,04	0,3	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 51	1: 1	5	95,7	0,3	2	95,6	0,89
			2,5	92,8	1,0	2		
			1,25	74,4	1,0	2		
			0,63	22,1	2,6	2		
			0,31	5,4	0,3	2		
			0,16	1,8	0,4	2		
			0,08	0,8	0,1	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 52	2: 1	5	95,4	0,6	2	95,1	0,89
			2,5	92,5	1,0	2		
			1,25	75,2	2,4	2		
			0,63	21,5	2,7	2		
			0,31	5,0	0,1	2		
			0,16	1,8	0,5	2		
			0,08	0,8	0,2	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 53	4: 1	5	94,3	0,4	2	95,5	1,18
			2,5	89,2	0,2	2		
			1,25	52,4	0,2	2		
			0,63	11,3	1,2	2		
			0,31	2,4	0,2	2		
			0,16	0,7	0,1	2		
			0,08	0,7	0,2	2		

LNP	ID LNP	Соотношение грузов	LNP (мкг)	Средний % CD3-	SD	N	Мак с.% CD3	EC50
			0,04	0,4	0,1	2	-	
35/15/47,5/2, 5	КОМПОЗИЦИЯ 54	1:2	5	97,3	0,5	2	97,3	0,29
			2,5	96,3	0,3	2		
			1,25	93,8	0,6	2		
			0,63	84,7	0,8	2		
			0,31	53,8	2,3	2		
			0,16	22,2	0,4	2		
			0,08	8,6	0,2	2		
			0,04	2,6	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 55	1:1	5	97,2	0,8	2	97,6	0,19
			2,5	97,1	1,0	2		
			1,25	96,9	0,2	2		
			0,63	93,7	0,4	2		
			0,31	76,8	2,9	2		
			0,16	42,1	0,7	2		
			0,08	15,9	0,7	2		
			0,04	5,8	0,1	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 56	2:1	5	97,2	0,7	2	97,2	0,24
			2,5	97,1	0,4	2		
			1,25	96,0	0,4	2		
			0,63	92,4	0,8	2		
			0,31	67,1	1,2	2		
			0,16	25,4	1,3	2		
			0,08	7,3	0,3	2		
			0,04	2,4	0,1	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 57	4:1	5	97,6	0,3	2	97,6	0,21
			2,5	97,3	0,5	2		
			1,25	96,2	0,6	2		
			0,63	94,9	0,3	2		
0,31			73,8	1,6	2			

LNP	ID LNP	Соотношение грузов	LNP (мкг)	Средний % CD3-	SD	N	Мак с.% CD3	EC50
			0,16	33,1	0,9	2	-	0
			0,08	9,5	0,1	2		
			0,04	3,3	0,5	2		

6.2 Оценка соотношения грузов в неактивированных Т-клетках

Влияние различных соотношений грузов на эффективность редактирования LNP выбранных LNP, описанных в Примере 6.1, проверили на неактивированных CD3-положительных Т-клетках. В данном исследовании применялись выбранные композиции LNP, описанные в Примере 6.1.

Т-клетки от двух доноров (Партия №W106, W790) готовили и трансфицировали, как описано в Примере 1. Через семь дней после трансфекции отредактированные неактивированные Т-клетки фенотипировали методом проточной цитометрии, как описано в Примере 1.

Процент CD3-отрицательных Т-клеток измеряли после обработки концентрациями LNP 0,04 мкг, 0,08 мкг, 0,16 мкг, 0,25 мкг, 0,63 мкг, 1,25 мкг, 2,5 мкг и 5 мкг. Среднее значение процента CD3-отрицательных Т-клеток, максимальное значение процента CD3 и EC50 при каждой дозе LNP приведены в Таблицах 16 и 17 и ФИГ. 4В

Таблица 16. Процент CD3-отрицательных клеток после обработки неактивированных Т-клеток LNP с различным соотношением грузов в донорных W106

LNP	ID LNP	Соотношение грузов	LNP (мкг)	Средний % CD3-	SD	N	Макс. % CD3-	EC50
50/10/38/1,5 (Сравнение)	КОМПОЗИЦИЯ 50	1:2	5	61,3	0,1	2	64,6	1,99
			2,5	44,1	0,1	2		
			1,25	13,3	0,0	2		
			0,63	4,9	0,0	2		
			0,31	2,1	0,0	2		
			0,16	1,5	0,0	2		
			0,08	1,5	0,0	2		
			0,04	1,6	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 51	1:1	5	65,5	0,0	2	67,5	1,86
			2,5	50,7	0,1	2		
			1,25	14,9	0,0	2		

			0,63	5,2	0,0	2		
			0,31	1,9	0,0	2		
			0,16	2,1	0,0	2		
			0,08	2,3	0,0	2		
			0,04	1,9	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 52	2:1	5	59,3	0,0	2	61,7	1,94
			2,5	43,5	0,1	2		
			1,25	13,9	0,0	2		
			0,63	2,4	0,0	2		
			0,31	2,4	0,0	2		
			0,16	2,5	0,0	2		
			0,08	2,1	0,0	2		
			0,04	3,1	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 53	4:1	5	42,6	0,0	2	48,2	2,96
			2,5	18,1	0,0	2		
			1,25	4,0	0,0	2		
			0,63	2,0	0,0	2		
			0,31	1,7	0,0	2		
			0,16	2,7	0,0	2		
			0,08	2,7	0,0	2		
			0,04	1,9	0,0	2		
35/15/47,5/2,5	КОМПОЗИЦИЯ 54	1:2	5	71,4	0,0	2	71,7	0,65
			2,5	69,6	0,0	2		
			1,25	61,8	0,0	2		
			0,63	34,7	0,0	2		
			0,31	10,8	0,0	2		
			0,16	3,5	0,0	2		
			0,08	2,0	0,0	2		
			0,04	2,3	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 55	1:1	5	76,5	0,1	2	78,9	0,57
			2,5	80,0	0,0	2		
			1,25	70,9	0,0	2		
			0,63	45,8	0,0	2		
			0,31	15,9	0,0	2		

			0,16	5,3	0,0	2		
			0,08	3,9	0,0	2		
			0,04	2,8	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 56	2:1	5	69,2	0,0	2	68,6	0,66
			2,5	66,5	0,0	2		
			1,25	53,8	0,1	2		
			0,63	36,5	0,1	2		
			0,31	7,2	0,0	2		
			0,16	3,0	0,0	2		
			0,08	2,5	0,0	2		
			0,04	1,9	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 57	4:1	5	66,1	0,0	2	64,2	0,53
			2,5	65,0	0,1	2		
			1,25	58,8	0,0	2		
			0,63	44,4	0,1	2		
			0,31	7,8	0,0	2		
			0,16	2,9	0,0	2		
			0,08	2,4	0,0	2		
			0,04	2,9	0,0	2		

Таблица 17. Процент CD3-отрицательных клеток после обработки неактивированных Т-клеток LNP с различным соотношением грузов в донорных W790

LNP	ID LNP	Соотношение грузов	LNP (мкг)	Средний % CD3-	SD	N	Макс .% CD3-	EC50
50/10/38/1,5 (Сравнение)	КОМПОЗИЦИЯ 50	1:2	5	86,6	0,0	2	88,9	1,63
			2,5	70,2	0,0	2		
			1,25	36,7	0,0	2		
			0,63	11,5	0,0	2		
			0,31	12,3	0,1	2		
			0,16	13,5	0,0	2		
			0,08	11,4	0,0	2		
	0,04	7,8	0,0	2				
		КОМПОЗИЦИЯ 51	1:1	5	84,1	0,0	2	86,5
	2,5			70,6	0,0	2		

			1,25	29,2	0,0	2		
			0,63	14,9	0,1	2		
			0,31	12,5	0,0	2		
			0,16	8,4	0,0	2		
			0,08	8,2	0,0	2		
			0,04	8,2	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 52	2:1	5	79,8	0,0	2	82	1,82
			2,5	63,1	0,1	2		
			1,25	25,6	0,0	2		
			0,63	9,8	0,0	2		
			0,31	7,7	0,0	2		
			0,16	9,9	0,0	2		
			0,08	10,2	0,0	2		
			0,04	9,7	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 53	4:1	5	64,1	0,0	2	72	2,62
			2,5	38,6	0,0	2		
			1,25	16,0	0,1	2		
			0,63	9,6	0,0	2		
			0,31	9,1	0,0	2		
			0,16	7,9	0,0	2		
			0,08	10,6	0,0	2		
			0,04	11,0	0,0	2		
35/15/47,5/2, 5	КОМПОЗИЦИЯ 54	1:2	5	91,3	0,0	2	89,3	0,51
			2,5	86,4	0,0	2		
			1,25	80,5	0,0	2		
			0,63	60,6	0,0	2		
			0,31	25,5	0,0	2		
			0,16	11,6	0,0	2		
			0,08	12,6	0,0	2		
			0,04	7,4	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 55	1:1	5	94,1	0,0	2	94	0,39
			2,5	91,4	0,0	2		
			1,25	90,7	0,0	2		
			0,63	72,4	0,0	2		

			0,31	40,0	0,0	2		
			0,16	17,9	0,0	2		
			0,08	9,7	0,0	2		
			0,04	8,8	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 56	2:1	5	92,6	0,0	2	90,3	0,61
			2,5	84,3	0,0	2		
			1,25	82,2	0,0	2		
			0,63	51,7	0,0	2		
			0,31	22,3	0,1	2		
			0,16	17,7	0,1	2		
			0,08	9,8	0,0	2		
			0,04	11,5	0,0	2		
	КОМПОЗИЦИЯ 57	4:1	5	89,4	0,0	2	86,9	0,50
			2,5	87,1	0,0	2		
			1,25	79,9	0,0	2		
			0,63	64,5	0,0	2		
			0,31	22,8	0,0	2		
			0,16	9,7	0,0	2		
			0,08	14,5	0,1	2		
			0,04	10,5	0,0	2		

Пример 7 - Оценка активности композиции LNP в условиях сывороточной среды

Для оценки эффективности редактирования LNP композиции LNP протестировали *in vitro*, чтобы оценить влияние альтернативных условий среды на эффективность введения в CD3-положительные Т-клетки. Т-клетки обрабатывали композициями LNP с различным молярным соотношением липидных компонентов, инкапсулирующих mPHK Cas9 и sgPHK, нацеленную на ген TRAC. Вирусная конструкция AAV6 доставляла матрицу гомологически направленной репарации (HDRТ), кодирующую репортер GFP, фланкированный гомологическими плечами для сайт-специфической интеграции в локус TRAC. 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.

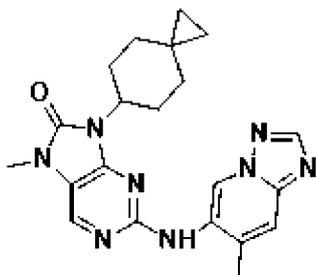
В целом LNP готовили по Примеру 1 с липидной композицией, указанной в Таблице 18, выраженной как молярное соотношение ионизируемого Соединения 6/DSPC/холестерина/PEG, соответственно. LNP доставляла mPHK, кодирующую Cas9 (SEQ ID No. 4) и sgPHK (SEQ ID NO. 10) нацеленную на человеческий TRAC. Соотношение грузов sgPHK и mPHK Cas9 составляло 1:2 по массе.

Композиции LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), общее содержание РНК и эффективность инкапсуляции РНК, как описано в Примере 1 и результаты представлены в Таблице 18. Анализ липидов продемонстрировал фактическое содержание липидов в моль%, как представлено в Таблице 1.

Таблица 18. Результаты анализа композиции LNP

ID LNP	Молярное соотношение композиции.	Инкапсуляция (%)	Z-средн. размер (нм)	PDI	Среднечисл. размер (нм)	Соотношение N/P
КОМПОЗИЦИЯ 1 (Сравнение)	50/10/38,5/1,5	98%	113	0,03	102	6
КОМПОЗИЦИЯ 16	35/15/47,5/2,5	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 2,5% сывороткой человека АВ (HABS), 2,5% заменителем сыворотки CTS Immune Cell SR (Gibco, Кат № A25961-01), 5% заменителем сыворотки (SR) или комбинацией 2,5% сывороткой человека АВ и 2,5% заменителем сыворотки. T-клетки активировали через 24 часа после размораживания, как описано в Примере 1.5. Через два дня после активации T-клетки трансфицировали LNP, как описано в Примере 1.6, 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: 7), 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 добавляли в концентрации 0,25 мкМ. Ингибитор, называемый в дальнейшем «Соединение 4 DNAPKI», представляет собой 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, также обозначается как:



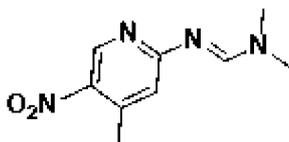
Соединение 4 DNAPKI готовили следующим образом:

Общая информация

Все реагенты и растворители приобретали и применяли в том виде, в каком они

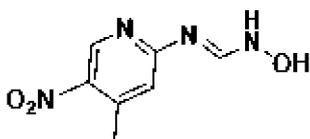
были получены от коммерческих поставщиков, или синтезированы в соответствии с указанными процедурами. Все промежуточные соединения и конечные соединения очищали посредством колоночной флэш-хроматографии на силикагеле. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker или Varian 400 МГц, а данные ЯМР регистрировали в CDCl₃ при температуре окружающей среды. Химические сдвиги указаны в миллионных долях (ppm) относительно CDCl₃ (7,26). Данные для ¹H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг, мультиплетность (bг=широкий, s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, dd=дублет дублетов, dt=дублет триплетов, m=мультиплет), константа связывания и интегрирование. Данные MS регистрировали на масс-спектрометре Waters SQD2 с источником ионизации электрораспылением (ESI). Чистоту конечных соединений определяли с помощью UPLC-MS-ELS с помощью прибора для жидкостной хроматографии Waters Acquity H-Class, оснащенного масс-спектрометром SQD2 с детекторами фотодиодной матрицы (PDA) и испарительного светорассеяния (ELS).

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



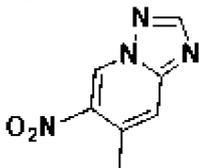
К раствору 4-метил-5-нитропиридин-2-амина (5 г, 1,0 экв.) в толуоле (0,3 М) добавляли DMF-DMA (3,0 экв.). Смесь перемешивали при 110°C в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде твердого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

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



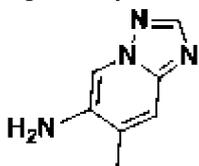
К раствору промежуточного соединения 1a (4 г, 1,0 экв.) в MeOH (0,2 М) добавляли NH₂OH·HCl (2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 1 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток распределяли между H₂O и EtOAc с последующей двукратной 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 NMR (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 10,52 (d, J=3,8 Гц, 1H), 10,08 (dd, J=9,9, 3,7 Гц, 1H), 8,84 (d, J=3,8 Гц, 1H), 7,85 (dd, J=9,7, 3,8 Гц, 1H), 7,01 (d, J=3,9 Гц, 1H), 3,36 (s, 3H).

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



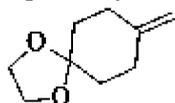
К раствору промежуточного соединения 1b (2,5 г, 1,0 экв.) в THF (0,4 М) добавляли трифторуксусный ангидрид (1,0 экв.) при 0 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 18 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (44%). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,53 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 2,78 (d, J=1,0 Гц, 3H).

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



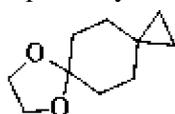
К смеси Pd/C (10% w/w, 0,2 экв.) в EtOH (0,1 М) добавляли промежуточное соединение 1c (1,0 экв. и формиат аммония (5,0 экв.). Смесь нагревали при 105 °С в течение 2 часов. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной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

Промежуточное соединение 1e: 8-метилен-1,4-диоксаспиро[4.5]декан.



К раствору метил(трифенил)фосфония бромид (1,15 экв.) в THF (0,6 М) по каплям добавляли *n*-BuLi (1,1 экв.) при -78 °С и смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-он (50 г, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°С в течение 12 ч. Реакционную смесь выливали в водн. NH₄Cl при 0 °С, разбавляли H₂O и трижды экстрагировали 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%). ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,67 (s, 1H), 3,96 (s, 4H), 2,82 (t, J=6,4 Гц, 4H), 1,70 (t, J=6,4 Гц, 4H).

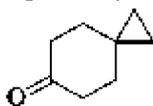
Промежуточное соединение 1f: 7,10-диоксадиспиро[2.2.4⁶.2³]додекан.



К раствору промежуточного соединения 4a (5 г, 1,0 экв.) в толуоле (3 М) по каплям

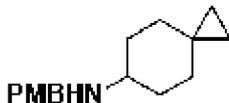
добавляли $ZnEt_2$ (2,57 экв.) при $-40\text{ }^\circ\text{C}$ и смесь перемешивали при $-40\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. Затем к смеси по каплям добавляли дийодметан (6,0 экв.) при $-40\text{ }^\circ\text{C}$ в атмосфере N_2 . Затем смесь перемешивали при $20\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 17 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь выливали в водн. NH_4Cl при $0\text{ }^\circ\text{C}$ и дважды экстрагировали $EtOAc$. Объединенные органические фазы промывали соляным 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 1g: спиро[2,5]октан-6-он



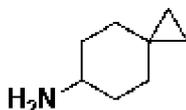
К раствору промежуточного соединения 4b (4 г, 1,0 экв.) в 1:1 THF/ H_2O (1,0 M) добавляли TFA (3,0 экв.). Смесь перемешивали при $20\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 2 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления THF и pH остатка доводили до 7 с помощью 2 M NaOH (водн.). Смесь выливали в воду и трижды экстрагировали с применением $EtOAc$. Объединенную органическую фазу промывали соляным 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 (t, $J=6,6$ Гц, 4H), 1,62 (t, $J=6,6$ Гц, 4H), 0,42 (s, 4H).

Промежуточное соединение 1h: N-(4-метоксибензил)спиро[2,5]октан-6-амин



К смеси промежуточного соединения 4с (2 г, 1,0 экв.) и (4-метоксифенил)метанамина (1,1 экв.) в DCM (0,3 M) добавляли $AcOH$ (1,3 экв.). Смесь перемешивали при $20\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 ч в атмосфере N_2 . Затем к смеси добавляли $NaBH(OAc)_3$ (3,3 экв.) при $0\text{ }^\circ\text{C}$ и смесь перемешивали при $20\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 17 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM, полученный остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3x $EtOAc$. Объединенные органические слои промывали соевым 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 твердого вещества серого цвета (51%). 1H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 7,15-7,07 (m, 2H), 6,77-6,68 (m, 2H), 3,58 (s, 3H), 3,54 (s, 2H), 2,30 (ddt, $J=10,1, 7,3, 3,7$ Гц, 1H), 1,69-1,62 (m, 2H), 1,37 (td, $J=12,6, 3,5$ Гц, 2H), 1,12-1,02 (m, 2H), 0,87-0,78 (m, 2H), 0,13-0,04 (m, 2H).

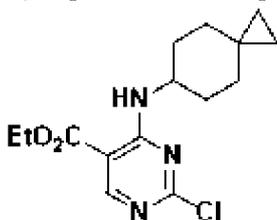
Промежуточное соединение 1i: спиро[2,5]октан-6-амин



К суспензии Pd/C (10% w/w, 1,0 экв.) в MeOH (0,25 M) добавляли промежуточное

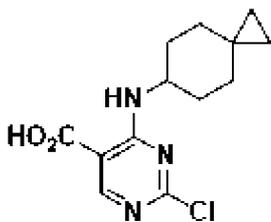
соединение 4d (2 г, 1,0 экв.) и смесь перемешивали при 80 °С при 50 Psi в течение 24 ч в атмосфере H_2 . Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 2,61 (tt, $J=10,8, 3,9$ Гц, 1H), 1,63 (ddd, $J=9,6, 5,1, 2,2$ Гц, 2H), 1,47 (td, $J=12,8, 3,5$ Гц, 2H), 1,21-1,06 (m, 2H), 0,82-0,72 (m, 2H), 0,14-0,05 (m, 2H).

Промежуточное соединение 1j: этил 2-хлор-4-(спиро[2.5]октан-6-иламино)пиримидин-5-карбоксилат.



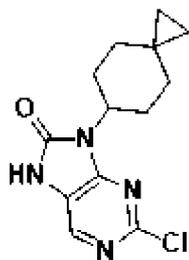
К смеси этил 2,4-дихлорпиримидин-5-карбоксилата (2,7 г, 1,0 экв.) и промежуточного соединения 1i (1,0 экв.) в ACN (0,5-0,6 М) добавляли K_2CO_3 (2,5 экв.) одной порцией в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 20°С в течение 12 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (54%). 1H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 8,64 (s, 1H), 8,41 (d, $J=7,9$ Гц, 1H), 4,33 (q, $J=7,1$ Гц, 2H), 4,08 (d, $J=9,8$ Гц, 1H), 1,90 (dd, $J=12,7, 4,8$ Гц, 2H), 1,64 (t, $J=12,3$ Гц, 2H), 1,52 (q, $J=10,7, 9,1$ Гц, 2H), 1,33 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 1,12 (d, $J=13,0$ Гц, 2H), 0,40-0,21 (m, 4H).

Промежуточное соединение 1k: 2-хлор-4-(спиро[2.5]октан-6-иламино)пиримидин-5-карбоновая кислота



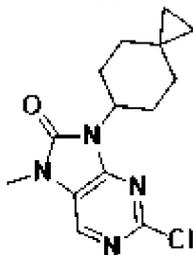
К раствору промежуточного соединения 1j (2 г, 1,0 экв.) в 1:1 THF/ H_2O (0,3 М) добавляли LiOH (2,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°С в течение 12 ч. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток доводили до pH 2 с применением 2 М HCl, осадок собирали фильтрованием, промывали водой и тестировали в вакууме. Продукт применяли непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (82%). 1H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 13,54 (s, 1H), 8,38 (d, $J=8,0$ Гц, 1H), 8,35 (s, 1H), 3,82 (qt, $J=8,2, 3,7$ Гц, 1H), 1,66 (dq, $J=12,8, 4,1$ Гц, 2H), 1,47-1,34 (m, 2H), 1,33-1,20 (m, 2H), 0,86 (dt, $J=13,6, 4,2$ Гц, 2H), 0,08 (dd, $J=8,3, 4,8$ Гц, 4H).

Промежуточное соединение 1l: 2-хлор-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



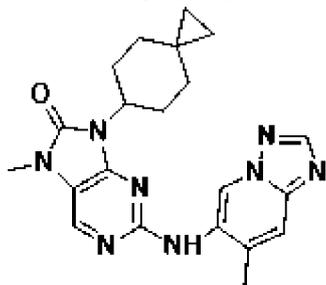
К смеси промежуточного соединения 1k (1,5 г, 1,0 экв.) и Et₃N (1,0 экв.) в DMF (0,3 М) добавляли DPPA (1,0 экв.). Смесь перемешивали при 120 °С в течение 8 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь выливали в воду. Преципитат собирали фильтрованием, промывали водой и сушили в вакууме, получая остаток, который применяли непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (67%). ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 11,68 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 4,26 (ddt, J=12,3, 7,5, 3,7 Гц, 1H), 2,42 (qd, J=12,6, 3,7 Гц, 2H), 1,95 (td, J=13,3, 3,5 Гц, 2H), 1,82-1,69 (m, 2H), 1,08-0,95 (m, 2H), 0,39 (tdq, J=11,6, 8,7, 4,2, 3,5 Гц, 4H).

Промежуточное соединение 1m: 2-хлор-7-метил-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



К смеси промежуточного соединения 1l (1,0 г, 1,0 экв.) и NaOH (5,0 экв.) в 1:1 THF/H₂O (0,3-0,5 М) добавляли MeI (2,0 экв.). Смесь перемешивали при 20 °С в течение 12 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого твердого вещества (67%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,57 (s, 1H), 4,03 (tt, J=12,5, 3,9 Гц, 1H), 3,03 (s, 3H), 2,17 (qd, J=12,6, 3,8 Гц, 2H), 1,60 (td, J=13,4, 3,6 Гц, 2H), 1,47-1,34 (m, 2H), 1,07 (s, 1H), 0,63 (dp, J=14,0, 2,5 Гц, 2H), -0,05 (s, 4H).

Соединение 4 DNAPKI: 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-8H-пурин-8-он



Смесь Промежуточного соединения 1m (1,0 экв.) и Промежуточного соединения 1d (1,0 экв.), Pd(dppf)Cl₂ (0,2 экв.), XantPhos (0,4 экв.) и Cs₂CO₃ (2,0 экв.) в DMF (0,2-0,3 М) дегазировали и продували 3 раза N₂, и указанную смесь перемешивали при 130 °С в

течение 12 часов в атмосфере N₂. Затем смесь выливали в воду и трижды экстрагировали с применением DCM. Объединенную органическую фазу промывали соляным раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде не совсем белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 9,09 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 4,21 (t, J=12,5 Гц, 1H), 3,36 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 2,34 (dt, J=13,0, 6,5 Гц, 2H), 1,93-1,77 (m, 2H), 1,77-1,62 (m, 2H), 0,91 (d, J=13,2 Гц, 2H), 0,31 (t, J=7,1 Гц, 2H). MS: 405,5 m/z [M+H].

Через пять дней после трансфекции Т-клетки фенотипировали методом проточной цитометрии, как описано в Примере 1, для оценки эффективности введения композиций LNP. В Таблице 19 приведен процент CD3-отрицательных клеток. 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. Средний процент GFP-положительных Т-клеток для каждой среды представлен в Таблице 20 и на Фиг. 5. Клетки, экспрессирующие белок GFP, свидетельствуют об успешной вставке в геном.

Таблица 19 - Процент CD3-отрицательных Т-клеток после обработки активированных Т-клеток AAV и указанной композициями LNP.

LNP	Доза (мкг/мл)	2,5% HABS		2,5% SR		5% SR		2,5% HABS & 2,5% SR	
		Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
КОМПОЗИЦИЯ 1 50/10/38,5/1, 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
КОМПОЗИЦИЯ 16 35/15/47,5/2, 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 20. Процент GFP+ клеток после обработки активированных Т-клеток AAV и указанными композициями LNP.

LNP	Доза (мкг/мл)	2,5% HABS	2,5% SR	5% SR	2,5% HABS & 2,5% SR
-----	---------------	-----------	---------	-------	---------------------

		%GFP+ (среднее значение)	SD	%GF P+ (сред нее значе ние)	SD	%GF P+ (сред нее значе ние)	SD	%GF P+ (сред нее значе ние)	SD
КОМПОЗИ ЦИЯ 1 50/10/38,5/ 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
КОМПОЗИ ЦИЯ 16 35/15/47,5/ 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

Пример 8 - Оценка композиций LNP с различными sgPНК

Для оценки эффективности редактирования нескольких мишеней Т-клетки обрабатывали композициями LNP с различным молярным соотношением липидных компонентов, инкапсулирующих mPНК Cas9 и sgPНК, нацеленную на гены TRAC (SEQ ID NO: 10), TRBC (SEQ ID NO: 11), HLA-A (SEQ ID NO: 13) или СИТА (SEQ ID NO: 12). Редактирование TRAC или TRBC оценивали по увеличению процента CD3-отрицательных клеток после редактирования. Альфа-цепь и бета-цепь Т-клеточного рецептора, кодируемые TRAC или TRBC соответственно, необходимы для сборки комплекса Т-клеточный рецептор/CD3 и его транслокации на поверхность клетки. Соответственно, нарушение работы генов TRAC или TRBC путем редактирования генома приводит к потере белка CD3 на клеточной поверхности Т-клеток. СИТА является транскрипционным фактором, непосредственно участвующим в экспрессии генов HLA-класса II, соответственно, нарушение работы СИТА приводит к потере аллелей HLA-DR DP DQ на клеточной поверхности.

Лейкаферез здоровых людей от трех доноров (W0662, 110046967, 110044591) получали коммерческим путем (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли методом отрицательной селекции с помощью набора EasySep Human T-Cell Isolation Kit (Stem Cell Technology, кат. 17951) или с помощью положительной селекции на CD4/CD8 с применением StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8 MicroBeads (Milteny, каталог №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% pen-strep (Gibco, 15140-122), дополненная 200 МЕ/мл IL2 (Peprotech, 200-02), 5 нг/мл IL7 (Peprotech, 200-07), 5 нг/мл IL15 (Peprotech, 200-15), и 2,5% сыворотки крови человека (Gemini, 100-512). После покоя в течение ночи Т-клетки с плотностью 10^6 клеток/мл активировали реагентом T cell TransAct Reagent (разведение 1:100, Miltenyi) и обрабатывали LNP по следующим методикам:

Т-клетки трансфицировали LNP, составленными в соответствии с Примером 1, с липидными композициями, указанными в Таблице 21, выраженными как молярное соотношение ионизируемого Соединения 6/DSPC/холестерин/PEG. LNP доставляла мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO. 4) и sgРНК как указано. Соотношение грузов sgРНК к мРНК Cas9 составляло 1:2 по массе для композиций LNP 50/10/35,5/1,5 (Соединение 6/DSPC/холестерин/PEG) и 1:1 для композиций 35/15/47,5/2,5 (Соединение 6/DSPC/холестерин/PEG). Соотношение N:P составляло около 6, если не указано иное.

Активированные Т-клетки трансфицировали LNP, составленными, как описано ранее в Примере 1. Трансфекция LNP происходила в порядке и сроки после активации, как описано для каждой композиции в Таблице 26. Т-клетки, содержащие sgРНК, нацеленные на СПТА (SEQ ID NO: 12), обрабатывали LNP сразу после активации, Т-клетки, содержащие sgРНК, нацеленные на HLA-A (SEQ ID NO: 13), обрабатывали через 24 часа после активации, Т-клетки, содержащие sgРНК, нацеленные на TRAC (SEQ ID NO: 10), обрабатывали через 48 часов после активации, а Т-клетки, содержащие sgРНК, нацеленные на TRBC (SEQ ID NO: 11), обрабатывали через 72 часа после активации. Клетки, обработанные LNP, до применения инкубировали при 37°C с 5% CO₂.

Для каждой обработки LNP Т-клетки высевали в 96-луночный планшет в объеме 100 мкл. 8-точечное двукратное серийное разведение LNP, представленное в Таблице 21, начиная с 5 мкг/мл в качестве самой высокой конечной дозы LNP, проводили с полной средой для роста Т-клеток АроЕ, состоящей из базовой среды CTS OpTmizer, как описано ранее в Примере 1. Впоследствии 100 мкл смеси LNP-АроЕ добавляли к клеткам, высеянными в лунку, в результате чего конечная плотность составляла $0,5 \times 10^6$ /мл в конечном объеме 200 мкл, а конечная концентрация АроЕ составляла 5 мкг/мл. Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 24 ч, а затем разделили 1:4 на свежей среде.

После инкубации Т-клетки, обработанные LNP, собирали и анализировали на предмет целевого редактирования. Планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO₂ до дня 11, а затем собирали для анализа методом проточной цитометрии.

Анализ способом проточной цитометрии

Для оценки белков клеточной поверхности методом проточной цитометрии Т-клетки инкубировали с антителами, нацеленными на CD4 (Biolegend, кат. 300538) и CD8a (Biolegend, кат. 301049), смешанными с антителами, нацеленными на CD3 (Biolegend, кат. 300441) или HLA-DR, DP, DQ (Biolegend, кат. 361712) или HLA-A*02 (Biolegend кат. 343320). Впоследствии Т-клетки обрабатывали на приборе Cytotflex (Beckman Coulter).

Анализ данных проводили с помощью программного пакета FlowJo (v.10.6.1 или v.10.7.1). Вкратце, Т-клетки калибровали по лимфоцитам, а затем по одиночным клеткам. Эти единичные клетки калибровали по статусу CD4+/CD8+, из которых количественно определялись CD8+/CD3-, CD8+/HLA-DR, DP,DQ- или CD8+/HLA-A*02- клетки.

Процент клеток CD8+/CD3-, CD8+/HLA-DR, DP,DQ-, CD8+/HLA-A2- определяли количественно, чтобы определить процент клеточной популяции, в которой отредактированный целевой локус привел к нокауту TCR. Для построения кривых «доза-ответ» для TCR KO с помощью программы Prism GraphPad (v.9.0) применяли модель линейной регрессии. Для каждой LNP рассчитывались полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀) и максимальное процентное значение CD3- кривой.

Композиции LNP анализировали на предмет Z-среднего и среднечислового размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в Примере 1 и результаты представлены в Таблице 21.

Таблица 21. Анализ композиции LNP

ID LNP	Номинальное молярное соотношение	sgРНК	Инкапсуляция (%)	Z-средн. размер (нм)	PDI	Средне числ. размер (нм)	Соотношение N/P
КОМПОЗИЦИЯ 58	50/10/38,5/1,5	SEQ ID NO: 12	99%	113	0,01	104	6
КОМПОЗИЦИЯ 59	50/10/38,5/1,5	SEQ ID NO: 13	99%	111	0,03	99	6
КОМПОЗИЦИЯ 1	50/10/38,5/1,5	SEQ ID NO: 10	98%	109	0,02	87	6
КОМПОЗИЦИЯ 60	50/10/38,5/1,5	SEQ ID NO: 11	98%	108	0,03	88	6
КОМПОЗИЦИЯ 23	35/15/47,5/2,5	SEQ ID NO: 10	99%	75	0,06	68	6
КОМПОЗИЦИЯ 61	35/15/47,5/2,5	SEQ ID NO: 11	99%	75	0,03	67	6
КОМПОЗИЦИЯ 62	35/15/47,5/2,5	SEQ ID NO: 12	99%	72	0,05	63	6
КОМПОЗИЦИЯ 63	35/15/47,5/2,5	SEQ ID NO: 13	99%	73	0,00	68	6

Процент CD3-отрицательных Т-клеток измеряли после обработки концентрациями LNP 0,04 мкг/мл, 0,08 мкг/мл, 0,16 мкг/мл, 0,31 мкг/мл, 0,63 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, и 5 мкг/мл. Анализ проводили в трех повторностях. Средний процент CD3-отрицательных Т-клеток, стандартное отклонение значения CD3 и EC50 при каждой дозе LNP представлены в Таблице 22-25 и на ФИГ. 6А-6D.

Таблица 22. Средний процент CD3-отрицательных клеток после обработки активированных Т-клеток указанными композициями LNP с TRAC, включающими sgРНК, нацеленную на TRAC (SEQ ID NO: 10).

Композиция LNP	LNP(мкг/мл)	Среднее значение	SD	EC50
50/10/38,5/1,5 (КОМПОЗИЦИЯ1)	5	98,1	1,2	0,77
	2,5	96,1	3,5	
	1,25	92,5	5,6	
	0,63	76,1	5,7	
	0,31	52,6	4,5	
	0,16	30,5	2,3	
	0,08	16,6	1,9	
	0,04	8,0	0,4	
35/15/47,5/2,5 (КОМПОЗИЦИЯ 23)	5	98,8	0,4	0,19
	2,5	98,7	0,2	
	1,25	97,9	0,7	
	0,63	92,3	2,0	
	0,31	72,7	3,3	
	0,16	46,3	3,7	
	0,08	25,2	3,5	
	0,04	12,9	2,4	

Таблица 23. Средний процент CD3-отрицательных клеток после обработки активированных Т-клеток указанными композициями LNP TRBC, включающими sgРНК, нацеленную на TRBC (SEQ ID NO: 11).

Композиция LNP	LNP(мкг/мл)	Среднее значение	SD	EC50
50/10/38,5/1,5(КОМПОЗИЦИЯ 60)	5	88,8	2,1	0,59
	2,5	87,7	0,9	
	1,25	78,1	2,3	
	0,63	47,4	4,6	

Композиция LNP	LNP(мкг/мл)	Среднее значение	SD	EC50
	0,31	24,6	4,9	
	0,16	11,9	2,9	
	0,08	5,0	1,0	
	0,04	2,2	0,4	
35/15/47,5/2,5 (КОМПОЗИЦИЯ 61)	5	89,6	0,5	0,09
	2,5	90,1	0,9	
	1,25	89,5	1,8	
	0,63	87,7	0,6	
	0,31	86,1	1,2	
	0,16	76,5	1,7	
	0,08	52,4	3,7	
	0,04	31,6	0,5	

Таблица 24. Средний процент CD3-отрицательных клеток после обработки активированных Т-клеток указанными композициями LNP СИТА, включающими sgРНК, нацеленную на СИТА (SEQ ID NO: 12).

Композиция LNP	LNP(мкг/мл)	Среднее значение	SD	EC50
50/10/38,5/1,5 (КОМПОЗИЦИЯ 58)	5	94,5	1,2	0,40
	2,5	92,7	1,2	
	1,25	92,6	1,3	
	0,63	79,5	1,2	
	0,31	49,8	5,8	
	0,16	33,9	9,6	
	0,08	30,2	8,5	
	0,04	26,3	10,7	
35/15/47,5/2,5 (КОМПОЗИЦИЯ 62)	5	96,4	0,3	0,12
	2,5	94,3	1,6	
	1,25	94,1	0,6	
	0,63	94,1	3,8	
	0,31	91,3	2,4	
	0,16	74,7	1,2	
	0,08	51,6	2,5	

Композиция LNP	LNP(мкг/мл)	Среднее значение	SD	EC50
	0,04	38,0	6,7	

Таблица 25. Средний процент CD3-отрицательных клеток после обработки активированных Т-клеток указанными композициями LNP HLA-A, включающими sgPHK, нацеленную на HLA-A (SEQ ID NO: 13).

Композиция LNP	LNP(мкг/мл)	Среднее значение	SD	EC50
50/10/38,5/1,5 (КОМПОЗИЦИЯ 59)	5	92,4	4,0	0,55
	2,5	92,2	4,3	
	1,25	82,0	9,7	
	0,63	52,3	18,0	
	0,31	25,1	15,0	
	0,16	9,5	5,3	
	0,08	3,9	2,7	
	0,04	1,5	1,3	
35/15/47,5/2,5 (КОМПОЗИЦИЯ 63)	5	95,5	3,3	0,15
	2,5	95,0	3,1	
	1,25	93,7	4,6	
	0,63	92,7	6,5	
	0,31	81,5	10,4	
	0,16	54,8	13,8	
	0,08	26,9	13,3	
	0,04	12,9	7,6	

Пример 9 - Последовательная доставка нескольких композиций LNP для множественных генных нарушений и вставок

Т-клетки конструировали с серией генных нарушений и вставок. Здоровые донорные клетки последовательно обрабатывали четырьмя композициями LNP, причем каждая композиция LNP была составлена совместно с mPHK, кодирующей Cas9 (SEQ ID NO: 4), и sgPHK, нацеленной либо на TRAC (SEQ ID NO: 10), TRBC (SEQ ID NO: 11), СПТА (SEQ ID NO: 12) или HLA-A (SEQ ID NO: 13). LNP составляли в соответствии с Группами, указанными в Таблице 26, либо с Соединением 6, DSPC, холестерином и PEG2k-DMG в молярном соотношении 35:15:47,5:2,5 (Группы 1 и 2), либо с Соединением 6, DSPC, холестерином и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:10:38,5:1,5 (Группа 3) соответственно в указанных дозах. Группы 1 и 2 различаются по концентрации LNP.

Липидные сборки нуклеиновых кислот имели молярное соотношение липидного амина и фосфата РНК (N:P) около 6, а соотношение gРНК и mРНК составляло 1:2 по массе. Трансгенный TCR, нацеленный на WT1 (SEQ ID NO: 14), сайт-специфически интегрировали в сайт разреза TRAC путем доставки матрицы гомологичной направленной репарации с помощью AAV. Группу LNP готовили каждый день и доставляли в Т-клетки, как описано в Таблице 26.

9.1 Приготовление Т-клеток

Т-клетки трех HLA-A*02:01+ серотипов выделяли из продуктов лейкофереза двух здоровых доноров (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли с применением набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя и криоконсервировали с применением Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies, кат. № 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 АВ [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]).

9.2 Обработка LNP и размножение Т-клеток

LNP размораживали и разбавляли каждый день в среде, содержащей ApoE, и доставляли к Т-клеткам следующим образом.

Таблица 26 - Порядок редактирования Т-клеточного конструирования

Группа	День 1 Редактирование (LNP композиция и конечная концентрация)	День 2 Редактирование (LNP композиция и конечная концентрация)	День 3 Редактирование (LNP композиция и конечная концентрация)	День 4 Редактирование (LNP композиция и конечная концентрация)
Группа 1	КОМПОЗИЦИЯ 62 (0,65 мкг/мл)	КОМПОЗИЦИЯ 63 (0,65 мкг/мл)	КОМПОЗИЦИЯ 23 (0,65мкг/мл) + WT1 (SEQ ID NO: 14) AAV+DNAPKI Соединение 4	КОМПОЗИЦИЯ 61 (0,65 мкг/мл)
Группа 2	КОМПОЗИЦИЯ 62 (2,5 мкг/мл)	КОМПОЗИЦИЯ 63 (2,5 мкг/мл)	КОМПОЗИЦИЯ 23 (2,5мкг/мл) + WT1 (SEQ ID NO: 14)	КОМПОЗИЦИЯ 61 (2,5 мкг/мл)

			AAV+DNAPKI Соединение 4	
Группа 3	КОМПОЗИЦИЯ 58 (2,5 мкг/мл)	КОМПОЗИЦИЯ 59 (2,5 мкг/мл)	КОМПОЗИЦИЯ 1 (2,5мкг/мл) + WT1 (SEQ ID NO: 14) AAV+DNAPKI Соединение 4	КОМПОЗИЦИЯ 60 (2,5 мкг/мл)
Неотредактированные	Нет	Нет	Нет	Нет

В день 1, LNP, как указано в Таблице 26, инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности 2×10^6 клеток/мл в TCAM с разбавлением 1:50 человеческого реагента T Cell TransAct (MilteNY, 130-111-160). Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы на ночь.

В день 2, LNP, как указано в Таблице 26, инкубировали в концентрации 25 мкг/мл в TCAM, содержащей 20 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 10:1.

В день 3, TRAC-LNP, как указано в Таблице 26, инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности 1×10^6 клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. Затем к каждой группе добавляли WT1 (SEQ ID NO: 14) AAV при показателе MOI 3×10^5 GC на клетку. В каждую группу добавляли ингибитор DNAPKI Соединение 4 в концентрации 0,25 мкМ.

В день 4, LNP, указанные в Таблице 26, инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности 1×10^6 клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы.

В дни 5-13, Т-клетки переносили на 24-луночный планшет GREX (Wilson Wolf, 80192) в среду для размножения Т-клеток (TCEM: CTS OpTmizer [Thermofisher #A3705001] с добавлением 5% сыворотки человека АВ [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], 5 нг/мл IL-15 [Peprotech #200-15]) и размножали в соответствии с протоколами производителей. Вкратце, Т-клетки размножали в течение 8 дней с заменой среды каждые 2-3 дня.

9.3 Количественная оценка редактирования Т-клеток с помощью проточной

цитометрии и NGS

После размножения отредактированные Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения нокаута HLA-A*02:01, нокаута HLA-DR-DP-DQ посредством нокаута СПТА, вставки WT1-TCR (CD3+Vb8+) и процента клеток, экспрессирующих остаточные эндогенные (CD3+Vb8-). Т-клетки инкубировали со коктейлем антител, нацеленным на следующие молекулы: Vb8 (Biolegend, кат. № 348104), HLA-A2 (Biolegend, кат. № 343320), HLA-DRDPDQ (Biolegend, кат. № 361712), CD4 (Biolegend, кат. № 300538), CD8 (Biolegend, кат. № 301046), CD3 (Biolegend, кат. № 317336), CCR7 (Biolegend, кат. № 353214), CD62L (Biolegend, кат. № 304820), CD45RA (Biolegend, кат. № 304134), CD45RO (Biolegend, кат. № 304230), CD56 (Biolegend, кат. № 318328) и Viakrome (Beckman Coulter, кат. № C36628). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью прибора Cytotflex LX (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки гейтировали по размеру и статусу CD4/CD8, прежде чем определять показатели редактирования и вставки.

Композиции LNP, применяемые для доставки mPHK Cas9 и sgPHK, нацеленных на локусы СПТА, HLA-A, TRAC и TRBC, анализировали, как описано в Примерах 1 и 8.

Процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки на клеточной поверхности после последовательного конструирования Т-клеток, продемонстрирован в Таблице 27 и на Фигуре 7А для CD8+ Т-клеток соответственно. Процент Т-клеток со всеми предполагаемыми редакторами (т.е., вставка WT1-TCR в сочетании с нокаутом HLA-A и СПТА; или % CD3+Vb8+ HLA-A-HLA-DRDPDQ-) приведен на Фиг. 7В для каждой группы. Высокие уровни нокаута HLA-A и СПТА, а также вставки WT1-TCR наблюдались в отредактированных образцах всех групп, что дало >75% полностью отредактированных CD8+ Т-клеток. Более низкая дозировка (0,65 мкг/мл), использованная в Группе 1, продемонстрировала такую же эффективность в редактировании Т-клеток по всем мишеням, как и составы Группы 2 и Группы 3 при более высокой дозе LNP (2,5 мкг/мл).

Таблица 27 Показатели редактирования в CD8+ Т-клетках

Группа	Группа 1			Группа 2			Группа 3			Неотредактированные		
	Среднее (%)	SD	N	Среднее (%)	SD	N	Среднее (%)	SD	N	Среднее (%)	SD	N
Полностью отредактированные (Vb8+,CD3+, HLA-	79,6	4,7	3	80,5	4,2	3	76,8	1,9	3	0,2	0,2	3

DRDPDQ- ,HLA- A*02:01-)													
HLA-A KO (HLA- A*02:01-)	97,1	3,6	3	96,4	4,7	3	96,4	4,4	3	3,6	3,8	3	
СИТА KO (HLA- DRDPDQ-)	99,3	0,4	3	97,7	2,1	3	98,7	0,9	3	нд	нд	3	
TCR KO (CD3-)	99,3	0,1	3	99,7	0,1	3	98,7	1,1	3	1,8	1,4	3	
Вставка WT1 TCR (Vb8+)	82,6	2,0	3	85,6	0,8	3	81,1	2,1	3	0,2	0,2	3	

Пример 10. Редактирование в НК-клетках

10.1. Композиции LNP

LNP составляли, как описано в Примере 1. LNP составляли с молярным соотношением липидамина к РНК-фосфату (N:P) около 6, соотношением sgРНК к mРНК Cas9 (соотношение грузов) 1:2 по массе для Композиции 64 или соотношением грузов 1:1 по массе для Композиции 65 и Соединения 6. LNP доставляют mРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID No. 4) и sgРНК (SEQ ID NO. 15), нацеленную на ген AAVS1 человека.

Липидные компоненты в LNP количественно анализировали с помощью HPLC с присоединенным детектором заряженных аэрозолей (CAD). Хроматографическое разделение 4 липидных компонентов достигали с помощью обращенно-фазовой HPLC. С помощью HPLC-анализа липидов были получены фактические молярные проценты (моль-%) липидов для каждого компонента композиций LNP, описанных в следующих примерах, как показано в Таблице 28.

Таблица 28. Результаты анализа липидов для композиций LNP

Композиция LNP	Молярное соотношение (номинальное)	Фактический или измеренный моль %			
		Липид	DSPC	Холестерин	PEG
Композиция 64	50/10/38,5/1,5	47,2	10,2	41,1	1,6
Композиция 65	35/15/47,5/2,5	35,0	14,4	48,2	2,4

Композиции LNP анализировали на предмет Z-среднего и среднечислового размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в Примере 1, и результаты представлены в Таблице 29.

Таблица 29. Анализ композиции LNP

Композиция LNP	Инкапсуляция (%)	Z-Средн. размер (нм)	PDI	Среднечисл. размер (нм)	Конц. РНК (мг/мл)	Соотношение N/P
Композиция 65	99%	70	0,04	61	0,07	6
Композиция 64	99%	105	0,01	98	0,07	6

НК-клетки выделяли из коммерчески полученного лейкопака от здорового донора с помощью набора EasySep Human NK Cell Isolation Kit (STEMCELL, кат. № 17955) согласно протоколу производителя. После выделения НК-клетки хранили в замороженном виде до тех пор, пока они не понадобятся. После размораживания, НК-клетки оставляли на ночь в среде CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion (Gibco, кат. № A10221-01) с 5% сывороткой человека АВ (GemCell, кат. № 100-512), 500 ед/мл IL-2 (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15), 10 мл Glutamax (Gibco, кат. № 35050-61), 10 мл HEPES (Gibco, кат. № 15630-080) и 1% пенициллина-стрептомицина (ThermoFisher, кат. № 15140-122). Затем отдохнувшие НК-клетки культивировали в соотношении 1:1 с облученными клетками K562, экспрессирующими 41BBL (SEQ ID NO:16) а мембраносвязанный IL21 (SEQ ID NO: 17) использовали в качестве питающих клеток для активации НК в указанной выше среде CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion в течение 3 дней.

Через три дня после активации НК-клетки обрабатывали LNP, доставляющими mРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 4) и sgРНК (SEQ ID NO: 15), нацеленную на locus AAVS1. 12 точковую кривую «доза-ответ» получали путем выполнения серии 2-кратных серийных разведений, начиная с 10 мкг/мл LNP, смешанных с ApoE3 (Peprotech 350-02) в концентрации 2,5 мкг/мл в вышеуказанной среде CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion с 2,5% сывороткой человека АВ и 0,25 мкМ DNAPKI, Соединение 4. Конечные концентрации общего груза РНК в LNP составляли 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, и 0 мкг/мл (необработанные контроли), как указано в Таблице 30. Смешанные LNP добавляли к НК-клеткам в количестве 1×10^6 клеток/мл в соотношении 1:1 в трех экземплярах.

Через семь дней после обработки LNP из клеток выделяли геномную ДНК и проводили NGS-анализ, как описано в Примере 1.

Средний процент редактирования, стандартное отклонение и EC50 композиций LNP в указанных концентрациях приведены в Таблице 30, а кривые «доза-ответ» - на Фиг. 8.

Таблица 30. Редактирование НК-клеток в процентах

Концентрация LNP	Композиция 64	Композиция 65
------------------	---------------	---------------

(мкг/мл)	Среднее значение	SD	EC50	Среднее значение	SD	EC50
10	98,4	0,3	1,1	97,1	0,3	0,1
5	98,1	0,2		97,6	0,7	
2,5	94,4	1,5		98,0	0,4	
1,25	58,4	8,6		97,4	0,8	
0,63	20,4	4,3		96,5	0,4	
0,31	5,5	1,2		87,2	1,2	
0,16	2,0	0,6		56,1	3,2	
0,08	0,6	0,1		34,1	1,2	
0,04	0,4	0,3		10,2	0,6	
0,02	0,2	0,1		1,9	0,5	
0,01	0,1	0,1		0,8	0,2	
0,005	0,1	0,0		0,3	0,1	
0	0,2	0,1		0,2	0,1	

Пример 11. Редактирование моноцитов и макрофагов

CD14⁺-клетки выделяли из лейкопака, полученного коммерческим путем (Nemacare), с помощью набора StraightFrom® Leukopak® CD14 MicroBead Kit, human (Miltenyi Biotec, Catalog, 130-117-020) по протоколу производителя на приборе MultiMACS™ Cell24 Separator Plus (Miltenyi Biotec). CD14⁺ клетки размораживали и культивировали в трех экземплярах по 50 000 клеток/лунку в базовой среде OpTmizer, как описано в Примере 1, с добавлением 10 нг/мл GM-CSF (Stemcell, 78140.1) при плотности клеток 5×10^5 /мл на 96-луночных планшетах для культивирования нетканевых клеток (Falcon, 351172). Каждые 2-3 дня 50% среды OpTmizer на лунку заменяли на 20 нг/мл свежей цитокиновой среды (GM-CSF (Stemcell, 78140.1), 2,5% человеческой сыворотки (HS) OpTmizer (Gibco, A3705001).

Клетки обрабатывали LNP, приготовленными, как описано в Примере 10. LNP преинкубировали при 37°C в течение 15 минут с ApoE3 (Perrotech 350-02) в концентрации 10 мкг/мл. Преинкубированные LNP добавляли к клеткам в соотношении 1:1 v/v, при этом конечная доза груза суммарной РНК составляла 0-1,25 мкг/мл.

После инкубации. 50 мкл концентраций LNP добавляли к моноцитам в тот же день, когда CD14⁺-клетки высевали на планшеты для культивирования без ткани (Falcon, 351172), и к макрофагам после 5 дней инкубации на планшетах для культивирования без ткани (Falcon, 351172). Планшеты с моноцитами и макрофагами инкубировали при 37 °C до их применения.

Через 6 дней после обработки LNP из моноцитов выделяли геномную ДНК, как описано в Примере 1, а клетки, сконструированные из макрофагов, собирали для NGS, как

описано в Примере 1.

Средний процент редактирования, стандартное отклонение и EC50 каждой композиции LNP в указанных концентрациях приведены в Таблице 31 для моноцитов и Таблице 32 для макрофагов. Кривые «доза-ответ» для моноцитов и макрофагов представлены на Фиг. 9А и 9В, соответственно.

Таблица 31. Средний процент редактирования через 6 дней после обработки моноцитов LNP с различными ионизируемыми липидами

Конц. LNP (нг/мл)	Композиция 65			Композиция 64		
	Среднее значение	SD	EC50	Среднее значение	SD	EC50
0	0,1	0	151	0,1	0	1080
4,88	0,2	0,2		0,6	0,4	
9,77	0,3	0,2		0,4	0,2	
19,53	0,7	0,2		0,4	0,1	
39,06	3,9	2,2		1,7	0,1	
78,13	17,3	2,6		5,8	1,7	
156,25	48	1,2		12,1	1,1	
312,5	85,2	1,1		26,6	2	
625	91,6	4,4		54,3	1,1	
1250	94,7	2,7		90,5	0,5	
2500	95,3	0,3		97,2	0,1	
5000	93,9	0,3		98,1	0,2	

Таблица 32. Средний процент редактирования через 6 дней после обработки макрофагов LNP с различными ионизируемыми липидами

Конц. LNP (нг/мл)	Композиция 65			Композиция 64		
	Среднее значение	SD	EC50	Среднее значение	SD	EC50
0	3,9	3,6	224,8	1,6	2,1	231,4
4,88	0,9	0,2		1,4	0,6	
9,77	1,3	0,1		2,3	0,3	
19,53	3,4	0,4		4,5	0,8	
39,06	8,8	0,2		13,4	1,4	
78,13	17,1	2,3		21,5	0,3	
156,25	33,9	1,6		42,5	2,6	
312,5	62,7	1,2		63,5	2,8	

Конц. LNP (нг/мл)	Композиция 65			Композиция 64		
	Среднее значение	SD	EC50	Среднее значение	SD	EC50
625	87,5	1,8		84,9	1,4	
1250	91,5	1,7		96,1	0,3	
2500	85,8	2,2		98,0	1,0	
5000	78,3	2,5		97,8	1,0	

Пример 12. Редактирование В-клеток

12.1. Выделение и культивирование В-клеток и приготовление сред

В-клетки (Nemacare) культивировали в среде Stemspan SFEM (StemCell Technologies, кат. 09650), дополненной 1% пенициллина-стрептомицина (ThermoFisher, кат. 15140122), 1 мкг/мл CpG ODN 2006 (Invivogen, кат. tlrl-2006-1), 50 нг/мл IL-2 (Peprotech, кат. 200-02), 50 нг/мл IL-10 (Peprotech, кат. 200-10) и 10 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. 200-15). В качестве дополнения к среде применялись также два компонента среды с различной концентрацией: 1. Человеческая сыворотка АВ (Gemini Bioproducts, кат. 100-512, партия № Н94Х00К, 2,5% и 5%) и 2. MEGACD40L (Enzo Life Sciences, кат. ALX-522-110-0000, 1нг/мл и 100нг/мл). Композиции сред для культивирования В-клеток, применяемые для приготовления В-клеточных культур, описаны в Таблице 33.

Таблица 33. Композиции сред для В-клеток

Номер среды	Композиция среды	
1	Среда StemSpan SFEM+Pen/Strep, IL2, IL10, IL15, CpG ODN, 1 нг/мл MEGACD40L	С 5% человеческой сывороткой АВ
2	Среда StemSpan SFEM+Pen/Strep, IL2, IL10, IL15, CpG ODN, 1 нг/мл MEGACD40L	С 2,5% человеческой сывороткой АВ
3	Среда StemSpan SFEM+Pen/Strep, IL2, IL10, IL15, CpG ODN, 100 нг/мл MEGACD40L	С 5% человеческой сывороткой АВ

В-клетки выделяли методом CD19-положительной селекции из лейкопака от здорового донора человека (Nemacare) с помощью набора StraightFrom Leukopak CD19 MicroBead (Miltenyi, 130-117-021) на приборе MultiMACS Cell24 Separator Plus в соответствии с инструкцией производителя. Выделенные CD19+ В-клетки хранили в замороженном виде в жидком азоте до тех пор, пока они не понадобятся.

Когда В-клетки были готовы к применению, их размораживали и активировали в

тот же день в Среде 1 для В-клеток (B Cell Media 1).

Через два дня после размораживания и активации В-клеток их культивировали в Среде 2 и обрабатывали LNP, доставляющими mРНК Cas9 (SEQ ID NO: 4) и gРНК (SEQ ID NO: 15), нацеленную на AAVS1. Для получения 8-точечной кривой «доза-ответ» протестировали несколько концентраций каждой LNP путем последовательного разведения 1:2, начиная с 20 мкг/мл общего груза РНК (4-кратная конечная доза). Затем добавляли 4 мкг/мл ApoE3 в Среду 2 для В-клеток (B Cell Media 2) (4х конечная доза), перед добавлением В-клеток в соотношении 1:1 v/v к смеси LNP-APOE3, в результате чего конечная доза общего груза РНК составила 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156, 0,078 мкг/мл, как указано в Таблице 34. Клетки обрабатывали LNP, приготовленными и проанализированными, как описано в Примере 10, или не обрабатывали LNP в качестве контроля.

Через три дня после обработки LNP клетки промывали и ресуспендировали в Среде 3 для В-клеток (B Cell Media 3). Через семь дней после обработки LNP из клеток выделяли геномную ДНК и проводили NGS-анализ, как описано в Примере 1.

Средний процент редактирования и стандартное отклонение композиций LNP при указанных концентрациях приведены в Таблице 34, а кривые «доза-ответ» - на Фиг. 10. «Необработанные В-клетки» не обрабатывались композицией LNP.

Таблица 34. Процентное редактирование в В-клетках

Липидная композиция	Конц. LNP (нг/мл)	Среднее значение	SD
Необработанные В-клетки	0	0,1	0
Композиция 65	5	50,3	5,52
	2,5	53,75	1,34
	1,25	60,9	0,14
	0,625	61,2	0,14
	0,313	30,85	0,50
	0,156	11,05	1,06
	0,078	3,05	0,35
Необработанные В-клетки	0	0,1	0
Композиция 64	5	58,1	9,19
	2,5	40,75	3,32
	1,25	5,75	8,13
	0,625	0,5	0,71
	0,313	0,45	0,21

	0,156	0,2	0,14
	0,078	0,15	0,07

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

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

Понятно, что если последовательность ДНК (содержащая Т) упоминается относительно РНК, то Т 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.

Таблица 35. Перечень последовательностей

Описание	SEQ ID NO	Последовательность
ORF, кодирующая Sp. Cas9	SEQ ID NO: 1	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA ACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAAT ACAAGGTCCTCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAA ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCG GAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAG CAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACA CAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAA TCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTT CTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTTCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAAC ATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGA CAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCAC AGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTG GCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCG AAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACA AGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACAGCT GTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA CGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAG CAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGG AGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGC ACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAAC TTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCA

AGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACA
TCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCT
GAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCA
CCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAG
CAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACC
AGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAG
GAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCC
GATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAAGCTGCT
GGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCA
GAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATC
CACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAG
GAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAA
AGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTA
CGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGC
ATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC
GTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAG
CGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAACTTCGAC
AAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCAC
AGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAAC
TGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAA
AGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAA
TCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAG
ACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCT
GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTG
ACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGATCGAAG
AAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAA
GGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGG
ATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAT
CAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTT
CCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATG

CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAG
ACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACA
GCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCC
GGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGT
CGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAA
GCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA
CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGA
AAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT
GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAA
CACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTAC
CTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAA
CTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACC
ACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCAT
CGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAG
AGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT
CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAA
CGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTG
ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGAC
AAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACA
AGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACA
GCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC
TGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAA
GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTCAGAGAAATCAACA ACTACCACCACGCACAC
GACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGA
TCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTA
CGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATC
GCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA
AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAA
GACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAA
GAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA
AATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTC
AGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCA
AGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGG
AAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGA

		<p>TCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACG GAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCT GGTCGTCGCAAAGGTTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAA GCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATC ATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGAC TTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAG GACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCG AACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCG CAGGAGAAGTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGC CGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCA CTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGA ACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTAC CTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCA AGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGT CCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAGCCGAT CAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACA CTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACT TCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCA CAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAG CATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGC CAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAG AAGAGAAAGGTCTAG</p>
<p>ORF, кодирующая Sp. Cas9</p>	<p>SEQ ID NO: 2</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCA CCAACCTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTA CAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAAC ACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCG CCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCAC CCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGG CGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCT CCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCA CCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAG AAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGG ACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTA CCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAG GCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACA</p>

TGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGA
CCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTC
ATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGG
AGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGC
CATCCTGTCCGCCC GGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTG
GAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAG
AACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGG
GCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACCTTCGACCTGGC
CGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTAC
GACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCT
GTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTG
AACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCTCCA
TGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGAC
CCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAG
AAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACG
GCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCTCCAGGA
GGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCATCCTGGAGAAG
ATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACC
GGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACA
ACGGCTCCATCCCCACCAGATCCACCTGGGGCGAGCT
GCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCC
TTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATC
CTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGC
CCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGACCCGGAAG
TCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGG
TGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGA
GCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAG
AAGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACT
TCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGT
GACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGTCCGGC
GAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTC AAGA
CCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGG
ACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGA
GATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTG

GGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA
AGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCT
GGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGAC
CGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCC
CACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGC
GGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAA
GCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAG
ACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCA
ACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCT
GACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCC
GGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACC
TGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCA
GACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGAT
GGGCCGGCACAAGCCCAGAACATCGTGATCGAGAT
GGCCCAGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAA
GAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGG
CATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCAC
CCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGT
ACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGT
GGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTAC
GACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGG
ACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGA
CAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAG
GAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAG
CTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCG
ACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGA
GCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTG
GAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCC
TGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAA
GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAG
TTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAG
CCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGC
CCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTC
GTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGA

		<p> TGATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCAC CGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTCT TCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCG GAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGG CGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACC GTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCAA GGAGTCCATCCTGCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTG ATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTAC GGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCT GGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAA GCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATC ATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCCATCGACT TCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACTCCCTGTTCGA GCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCC GGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCT CCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCTCCCCTAC GAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAACGAGCAG AAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGG ACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCG GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTG TCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGG AGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGAC CAACCTGGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCAC CGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTG GGCGGCGACGGCGGGCTCCCCAAGAAGAAGCGG AAGGTGTGA </p>
открытая рамка считывани я для Cas9 с меткой	SEQ ID NO: 3	<p> AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGC ACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAG UACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGC AACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGCGCCUUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAG </p>

Hibit	GCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGGCGGUAC ACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAG AUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCC UUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCUGGUGGAG GAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGC AACAUUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUAC CCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGAC UCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUG GCCUUGGCCACAUGAUCAAGUUCGGGGCCACUUC CUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGAC GUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUAC AACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCC GGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUG UCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAG CUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAAC CUGAUCGCCUGUCCUGGGCCUGACCCCAACUUC AAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUG CAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGAC AACCUGCUGGCCCAGAUCCGGCGACCAGUACGCCGAC CUGUUCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUC CUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUC ACCAAGGCCCCCGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGG UACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAG GCCUUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAG GAGAUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCC GGCUACAUCGACGGCGGGCCUCCAGGAGGAGUUC UACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGAC GGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAG GACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGC UCCAUCCCCCACCAGAUCACCUGGGCGAGCUGCAC GCCAUCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUC CUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCCGAGAAGAUCCUG ACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGCC CGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAG UCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAG
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

GUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUCAUC
GAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAAC
GAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAG
UACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAG
UACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUG
UCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUG
UUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUG
AAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGAC
UCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAAC
GCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUC
AUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACC
CUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUG
AAGACCUACGCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUG
AAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGC
CGGCUGUCCCGGAAGCUGAUAACGGCAUCCGGGAC
AAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUCCUGAAG
UCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUAUGCAGCUG
AUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAUC
CAGAAGGCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUG
CACGAGCACAUCGCCAACCGUGGCCGGCUCCCCGCCA
UCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGG
ACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCG
AGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGA
CCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGA
UGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCU
CCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCC
AGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGC
AGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGG
ACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACA
UCGUGCCCCAGUCCUUCUGAAGGACGACUCCAUCG
ACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGG
GCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGA
AGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACG
CCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGA

CCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACA
AGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCC
GGCAGAUACCAAGCACGUGGCCCAGAUCUGGACU
CCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGC
UGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCA
AGCUGGUGUCCGACUUCGGAAGGACUUCAGUUCU
ACAAGGUGCGGGAGAUAACAACUACCACCACGCCC
ACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGGCACC GCC
UGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCG
UGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGA
UGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCA
CCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACU
UCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGA
UCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGA
CCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCG
CCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGA
ACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCU
UCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCG
ACAAGCUGAUCGCCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCA
AGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCU
ACUCCGUGCUGGUGGGGCCAAGGUGGAGAAGGGCA
AGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGG
GCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGA
ACCCCAUCGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGG
AGGUGAAGAAGGACCUGAUAUCAAGCUGCCCAAGU
ACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGA
UGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACG
AGCUGGCCUUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCUGU
ACCUGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCC
CCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGC
AGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUAUCGAGCAGA
UCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCUGGCCGACG
CCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGC
ACCGGGACAAGCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACA
UCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCC

		<p>CCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACC GGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACG CCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACG AGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCG AGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGC UGUUCAAGAAGAUCUCCUGA</p>
<p>аминокисл отная последоват ельность, кодируема я SEQ ID NO: 1-3 Cas9</p>	<p>SEQ ID NO: 4</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNT DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKN RICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHP IFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYL ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQL FEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKN GLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDD LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITK APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP EKYKEIFFD QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF LKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEE TITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKA I VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRF NASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT LFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSR KLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTF KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNG RDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQR KFDNLTKAERGGLSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQI LDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFY KVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYG DYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEI TLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SM</p>

		PQVNIVKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGI TIMERSSEKPNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKL KGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADA NLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQL GGDGGGSPKKKRKV*
аминокисл отная последоват ельность для слияния Sp Cas9-Hibit	SEQ ID NO: 5	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKN RICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHP IFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYL ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQL FEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKN GLFGNLI ALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDD LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITK APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD QSKNGYAGYIDGGASQE EFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF LKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEE TITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKA I VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRF NASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSR KLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTF KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNG RDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQR KFDNLTKAERGGLSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQI LDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFY KVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYG DYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEI

		<p>TLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSP PQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGI TIMERSSEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKL KGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADA NLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQITGLYETRIDLSQL GGDGGGSPKKKRKVSESATPESVSGWRLFKKIS</p>
<p>Полная матрица HDRT - вставка GFP T2A GFP: P00894</p>	<p>SEQ ID NO: 6</p>	<p>GAGGGCCGCGGCAGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGG AGGAGAAAtCCCGGCCCCATGgtgAGCAAGGGCGAGGAG CTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGG CGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC CCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTG CCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCG TGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCA GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCA ACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG ACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA CTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTG GAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCA AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCT CGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCA CCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCG CGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAcc tCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC CCCTCCCCCGTGCCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCAC TCCCCTGTCTTCTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGT GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA</p>

		<p>GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTA TGGettctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggtatccccACTAGT CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAG TCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACA GACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCA AGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGA CTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTC CAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGgtaagggcagctttggt gccttcgcaggctgttccttcttcaggaatggccaggtctgccagagctctggtcaat gatgtctaaaactcctctgattgggtgtctcggccttatccattgccacaaaacctctttt actaagaaacagtgagccttgttctggcagtcagagaatgacacgggaaaaaagcaga tgaagagaaggtggcaggagagggcacgtggcccagcctcagtctct</p>
GFP- вставка для HDRT - GFP: P00894	SEQ ID NO: 7	<p>ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTG GTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG GCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCG ATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG CACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTC GTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCC GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAA GTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACC ATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCG CCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCG CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACA GCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA CGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGC AGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGC AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATGGTCCTGC TGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCAT GGACGAGCTGTACAAGTAA</p>
α цепь TCR pINT1066	SEQ ID NO: 8	<p>METLLKVLSTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGED AVINCSSSKALYSVHWYRQKHGEAPVFLMILLKGGEQK</p>

		GHEKISASFNEKKQQSSLYLTASQLSYSPTYFCGTAWIN DYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVE KSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS *
eGFP ORF GFP: P00894	SEQ ID NO: 9	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTG GTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG GCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCG ATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG CACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTC GTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCC GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAA GTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACC ATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCG CCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCG CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACA GCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA CGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGC AGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGC AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATGGTCCTGC TGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCAT GGACGAGCTGTACAAGTAA
sgPHK, нацеленная на TRAC	SEQ ID NO: 10	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
sgPHK, нацеленная на TRBC	SEQ ID NO: 11	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm

		GmCmU*mU*mU*mU
sgPHK, нацеленная на СИТА	SEQ ID NO: 12	mC*mC*mC*CCGGACGGUUCAAGCAAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
sgPHK, нацеленная на HLA-A	SEQ ID NO: 13	mA*mC*mA*GCGACGCCGCGAGCCAGGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
Вставка TCR HD1, включая ITR	SEQ ID NO: 14	ttggcactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggtegc ccgacgcccgggctttgcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgagagagg gagtggccaactccatcactaggggttcttagatcttccaacatacctccatt ctgctaagcccagcctaagttggggagaccactccagattccaagatgtacagtttctt gctgggcttttccatgcctgcttactctgccagagttatattgctggggtttgaaga gactctattaataaaagaataagcagtattattaagtagccctgcatttcaggttcctgag tggcaggccaggcctggcgtgaacgttactgaaatcatggcctcttggccaagattga tagcttgtgctgtccctgagtcacagtcacgagcagctggttctaagatgctattc ccgtataaagcatgagaccgtgacttgcagccccacagagccccgcccctgtccatcac tggcatctggactccagcctgggttggggcaagaggaaatgagatcatgtcctaacc ctgatcctcttgtcccacagatataccagaaccctgaccctgcggctccggtgccgctcag gggagagcgacatcggccacagtcgggagaaagttggggggaggggtcggcaatt gaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctgtgactg gctccgcttttccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaa cgttcttttgcacgggttgcgccagaacacagtaagtccgtgtgtgttcccgc gggcttggcctcttaccgggttatggcccttgcgtgcctgaacttccacgcccctggc tgcagtacgtgattctgatcccagcttgggttgaagtgggtgggagagttcgaggc cttgcgttaaggagcccccttgcctcgtgcttgagttgagcctggcttggcgctggg gccgccgctgcgaatctggggcacccttgcgctgtctcgtccttgcataagtctta gccattfaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagcttataatgc ggccaagatgtcacactggtatttctgggtttggggccgcccggcgacggggccc gtgctcccagcgacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgccgaccgagaa tcggacgggggtagctcaagctggccggcctgctctggtgcttggcctcgcgccgccg tgtatgccccgcccggggcgaaggctggcccggcaccagttgctgagcgg

	<p> aaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctc gggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaaggaaaaggcctttccgctcctcagc cgtcgcttcatgtgactccacggagfaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctc gagcttttgagtagctgctctttaggtggggggaggggtttatgcgatggagttcccc aactgagtggtggagactgaagtfaggccagcttggcacttgatgtaattctccttga atftgcccttttgagttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaagttttt cttccatttcaggtgctgtgatgcggccgccaccatgggatcttggacactgtgttgcgtg ccctgtgcatcctggtggccaagcacacagatgccggcgatccagctccttagacac gaagtgaccgagatgggccaagaagtgacctgcgctgcaagcctatcagcggccacg attacctgttctggtacagacagaccatgatgagaggcctggaactgctgatctacttaac aacaacgtgcccacgacgacagcggcatgccgaggatagattcagcggccaagatgc ccaacgccagctcagcacctgaagatccagcctagcagcccagagatagcggcgt gtacttctgcccagcagaaagacagggcgtacagcaatcagccccagcactttggag atggcaccggctgagcatcctggaagatctgaagaacgtgtcccacctgaggtggcc gtgttcgagcctctgaggccgagatcagccacacacagaaagccacactcgtgtgtctg gccaccggcttctatcccgatcacgtggaactgtcttgggggtaacggcaaagaggtg cacagcggcgctcagcaccgatcctcagcctctgaaagagcagcccgtctgaacgaca gcagatactgcctgagcagcagactgagagtgtccgccaccttctggcagaaccccaga aaccactfcagatgccaggtgcagttctacggcctgagcgagaacgatgagtgacca ggatagagccaagcctgtgacacagatcgtgtctgccgaagcctggggcagagccgatt gtggctftaccagcgagagctaccagcaggcgtgctgtctgccacaatcctgtacgaga tctgtctgggcaaagccactctgtacgccgtgctggtgtctgccctgggtgctgatggccat ggtcaagcgggaaggatagcagggcggctccgggtgccacaaacttctccctgctcaag caggccggagatgtggaagagaaccctggccctatgaaacccctgctgaaggtgctga gcccacactgctgtggcagctgacatgggtccgatctcagcagcctgtgcagtctcctc aggccgtgattctgagagaaggcaggacgccgtgatcaactgcagcagctctaaggc cctgtacagcgtgactggtacagacagaagcacggcgaggccctgtgttctgatgat cctgctgaaaggcggcgagcagaaggccacgagaagatcagcggcagcttcaacga gaagaagcagcagtcagcctgtacctgacagccagccagctgagctacagcggcacc factttgtggcaccgctggatcaacgactacaagctgtcttccggagccggcaccacag tgacagtgcgggccaatattcagaacccgatcctgccgtgtaccagctgagagacagc aagagcagcgacaagagcgtgtgcctgttcaccgacttcgacagccagaccaacgtgc ccagagcaaggacagcagctgtacatcaccgataagactgtgtggacatgcccagc atggacttcaagagcaacagcggcgtggcctgtccaacaagagcgatttgcctgcgc caacgccttcaacaacagcattatccccgaggacacatttcccaagtcctgagagcag </p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		<p>ctgcgacgtgaagctggtggaaaagagcttcgagacagacaccaacctgaactccaga acctgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgetcaaggtggccggctcaacctgctgat gacctgagactgtggtccagctaacctCGACTGTGCCTTCTAGTTGC CAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTTCCTT GACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAAT AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG TCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC AAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCT GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGcttctgagcggaagaaccagct ggggctctagggggtatcccactagctgtgtaccagctgagagactctaaatccagtga caagtctgtctgctattaccgattttgattctcaacaatgtgtcacaaagtaaggattct gatgtgtatcacagacaaaactgtgctagacatgaggctatggactcaagagcaaca gtgtgtggcctggagcaacaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcat tattccagaagacaccttctcccagcccaggttaaggcagctttggtgccttcgcaggc tgttccttgcctcaggaatggccaggttctgccagagctctggtcaatgatgtctaaaact cctctgattggtggtctcggccttatccattgccacaaaacctcttttactaagaaacagt gagccttgtctggcagtcagagaatgacacgggaaaaagcagatgaagagaaggt ggcaggagagggcacgtggcccagcctcagctctagatctaggaaccctagtgatgg agttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgagggccggccgggcaaagccc gggcgtcgggcgacctttggtcggccgctcagtgagcgagcgagcgcgcagagag ggagtggccaa</p>
sgPHK, нацеленная на AAVS1	15	<p>mC*mC*mA*AUUCAGGAGACUAGGAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU</p>
41BBL	16	<p>MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLL LLLAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE</p>
mIL21	17	<p>MDWTWILFLVAAATRVHSHKSSSQGQDRHMIRMRLID IVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQ</p>

		LKSANTGNNERIINVSIIKLLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCP SCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSRTHGSEDSE QKLISEEDLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WV
--	--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липидная композиция, содержащая:

биологически активный агент; и

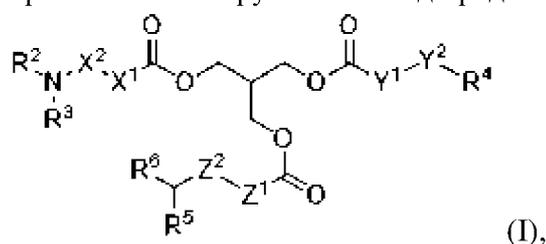
липидный компонент, при этом липидный компонент содержит:

a) ионизируемый липид в количестве от около 25-45 моль % от липидного компонента;

b) нейтральный липид в количестве от около 10-30 моль % от липидного компонента;

c) вспомогательный липид в количестве от около 25-65 моль % от липидного компонента; и

d) PEG-липид в количестве от около 1,5-3,5 моль % от липидного компонента; при этом ионизируемый липид представляет собой соединение Формулы (I)



где

X^1 представляет собой O, NH или прямую связь;

X^2 представляет собой C_{2-3} алкилен;

R^3 представляет собой C_{1-3} алкил;

R^2 представляет собой C_{1-3} алкил, или

R^2 вместе с атомом азота, к которому он присоединен, и 2-3 атомами углерода X^2 образуют 5- или 6-членное кольцо, или

R^2 и R^3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо;

Y^1 представляет собой C_{6-10} алкилен;

Y^2 выбран из ;

R^4 представляет собой C_{4-11} алкил;

Z^1 представляет собой C_{2-5} алкилен;

Z^2 представляет собой или отсутствует;

R^5 представляет собой C_{6-8} алкил, C_{5-10} алкокси (например, $-OC_{5-10}$ галоалкил), $-O(C_{2-3}$ алкил) OC_{6-10} алкил, $-OC_{6-10}$ алкенил (например, $-OC_{6-10}$ разветвленный алкенил), или $-OC_{6-10}$ алкинил, и

R^6 представляет собой C_{6-8} алкил, C_{5-10} алкокси (например, $-OC_{5-10}$ галоалкил), $-O(C_{2-3}$ алкил) OC_{6-10} алкил, $-OC_{6-10}$ алкенил (например, $-OC_{6-10}$ разветвленный алкенил), или

-OC₆₋₁₀ алкинил, или

R⁵ вместе с R⁶ образуют 6-членный циклический ацеталь, замещенный геминальным C₆₋₈ алкилом;

или его соль.

2. Липидная композиция, содержащая:

биологически активный агент; и

липидный компонент, при этом липидный компонент содержит:

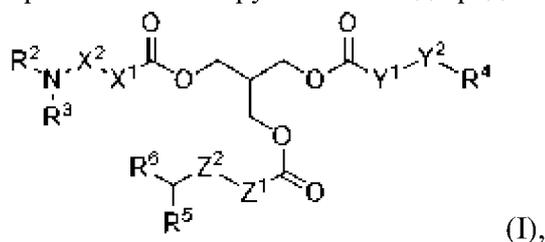
a) ионизируемый липид в количестве от около 25-45 моль % от липидного компонента;

b) нейтральный липид в количестве от около 10-30 моль % от липидного компонента;

c) вспомогательный липид в количестве от около 25-65 моль % от липидного компонента; и

d) PEG-липид в количестве от около 1,5-3,5 моль % от липидного компонента;

при этом ионизируемый липид представляет собой соединение Формулы (I)



где

X¹ представляет собой O, NH или прямую связь;

X² представляет собой C₂₋₃ алкилен;

R³ представляет собой C₁₋₃алкил;

R² представляет собой C₁₋₃ алкил, или

R² вместе с атомом азота, к которому он присоединен, и 2-3 атомами углерода X² образуют 5- или 6-членное кольцо, или

R² и R³ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо;

Y¹ представляет собой C₆₋₁₀ алкилен;

Y² выбран из , и ;

R⁴ представляет собой C₄₋₁₁ алкил;

Z¹ представляет собой C₂₋₅ алкилен;

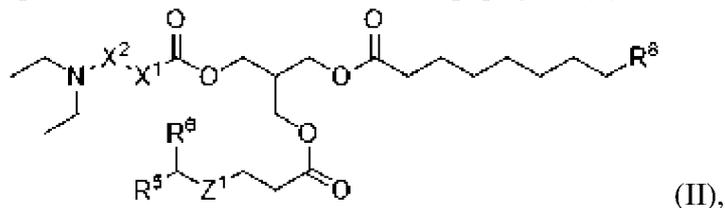
Z² представляет собой или отсутствует;

R⁵ представляет собой C₆₋₈ алкил или C₆₋₈ алкокси; и

R⁶ представляет собой C₆₋₈ алкил или C₆₋₈ алкокси

или его соль.

3. Липидная композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (II)



где

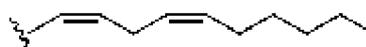
X^1 представляет собой O, NH или прямую связь;

X^2 представляет собой C_{2-3} алкилен;

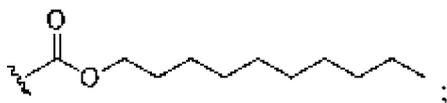
Z^1 представляет собой C_3 алкилен, а R^5 и R^6 каждый C_6 алкил, или Z^1 представляет собой прямую связь, а R^5 и R^6 каждый C_8 алкокси; и

R^8 представляет собой

собой



или



или его соль.

4. Липидная композиция, содержащая:

биологически активный агент; и

липидный компонент, при этом липидный компонент содержит:

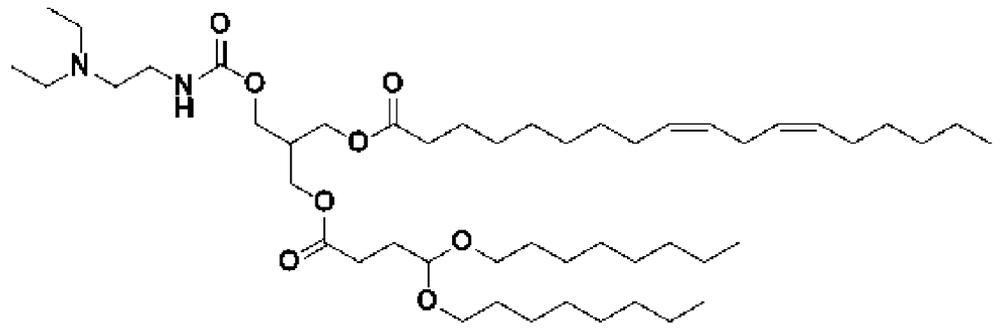
a) ионизируемый липид в количестве от около 25-45 моль % от липидного компонента;

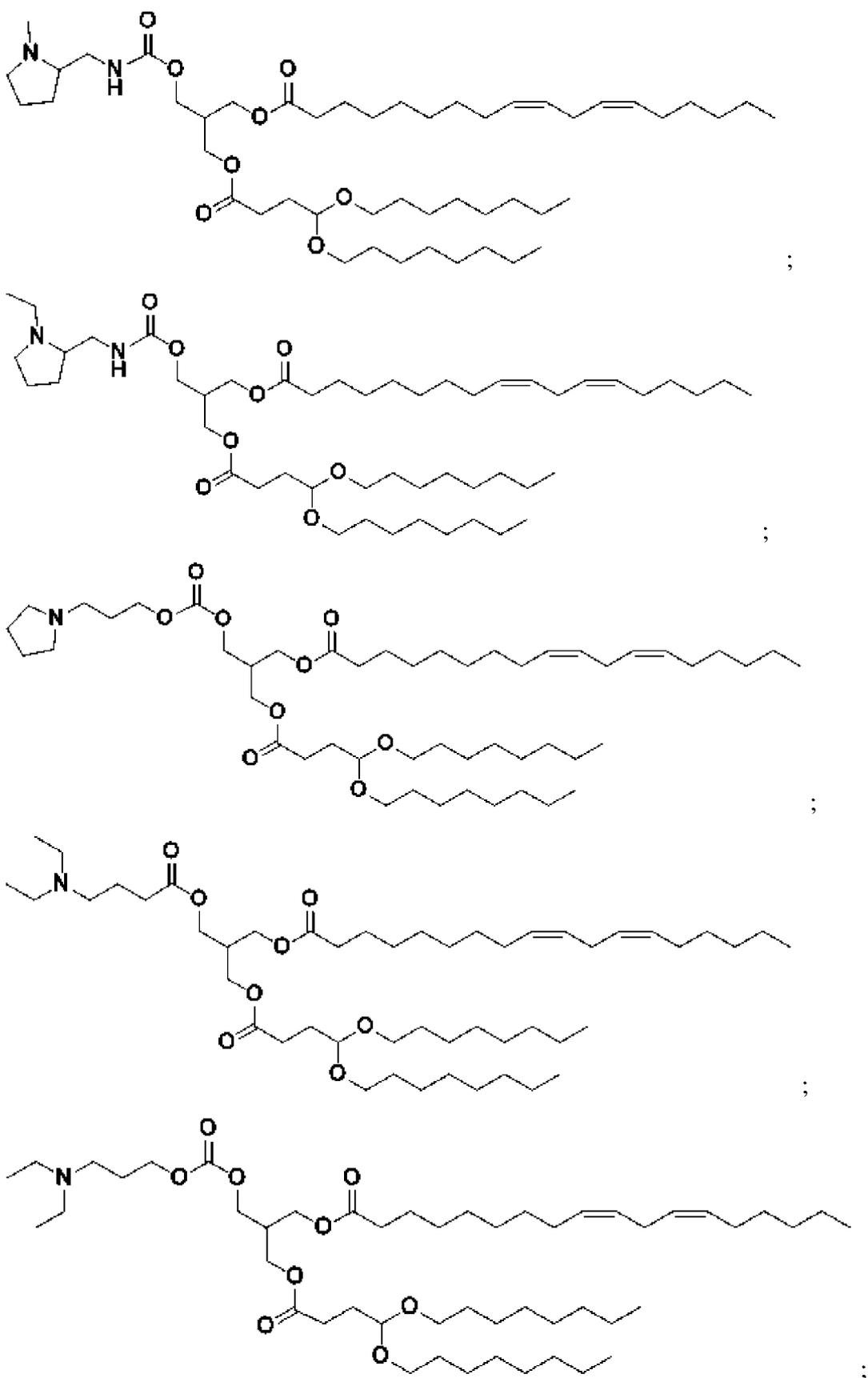
b) нейтральный липид в количестве от около 10-30 моль % от липидного компонента;

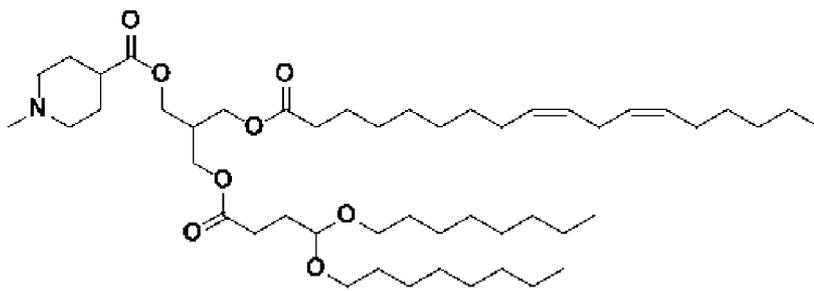
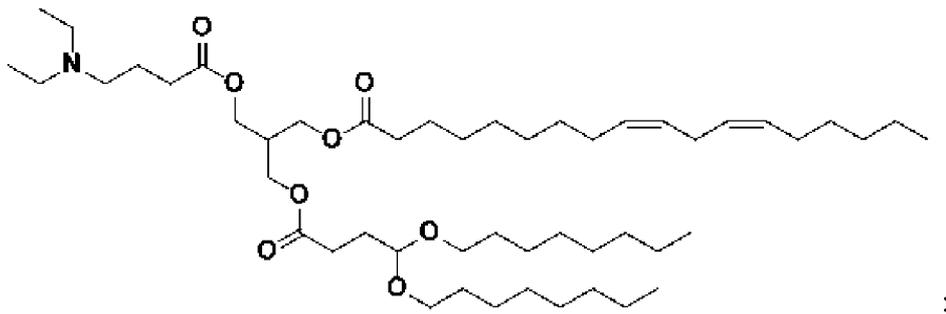
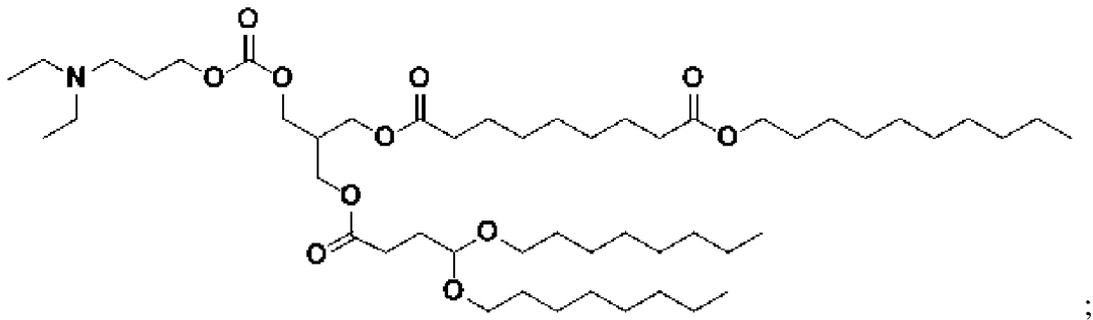
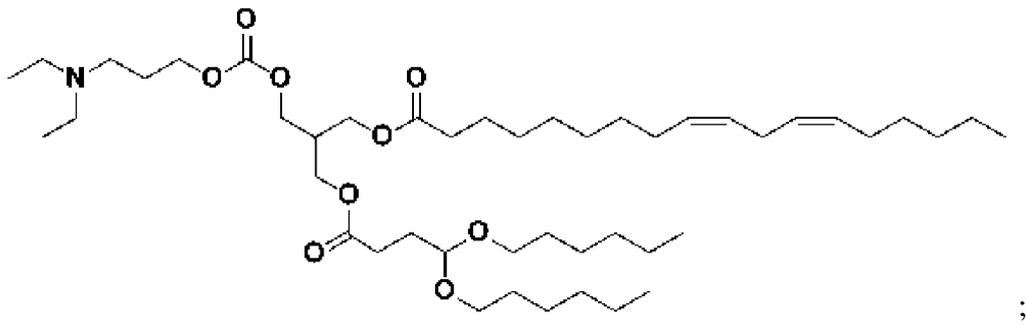
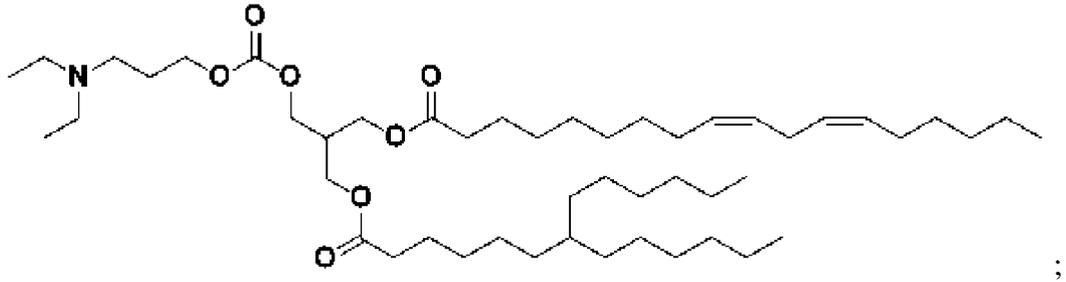
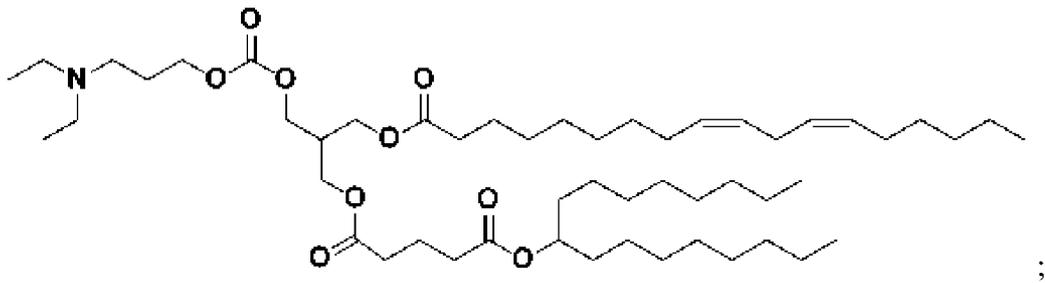
c) вспомогательный липид в количестве от около 25-65 моль % от липидного компонента; и

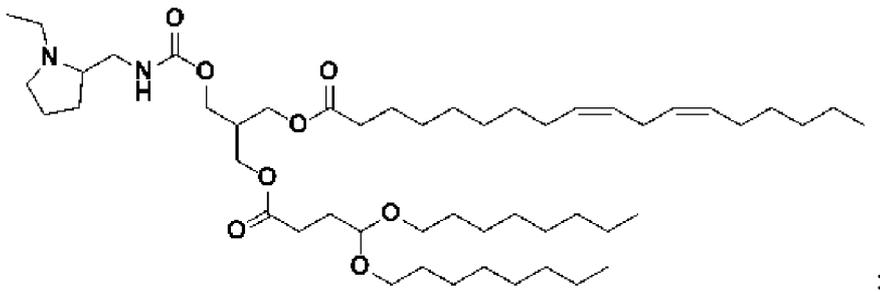
d) PEG-липид в количестве от около 1,5-3,5 моль % от липидного компонента;

при этом ионизируемый липид представляет собой

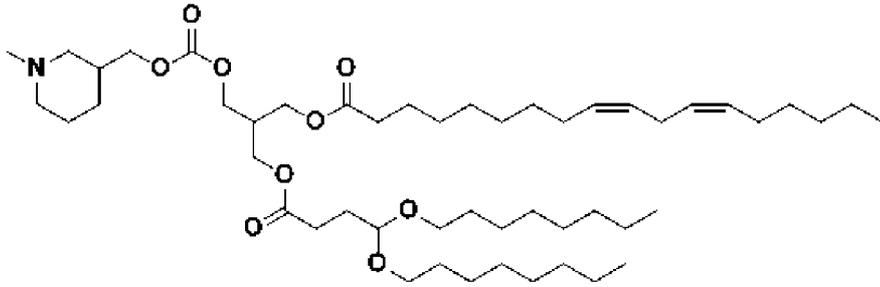




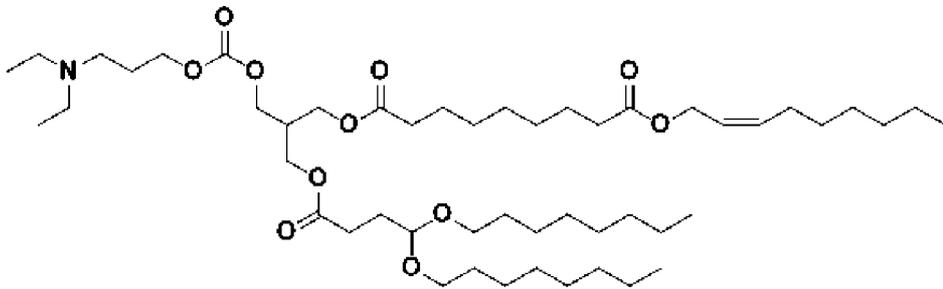




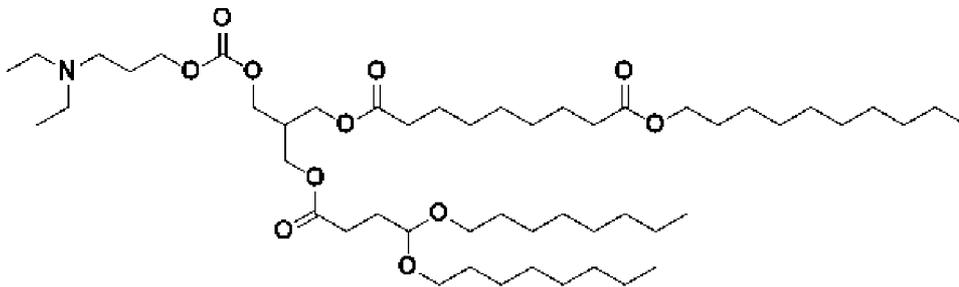
;



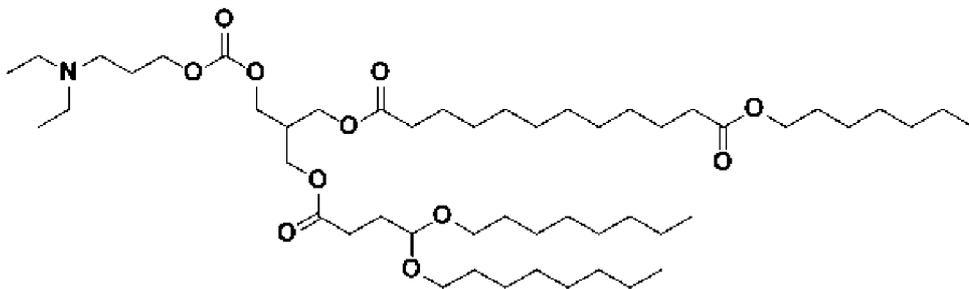
;



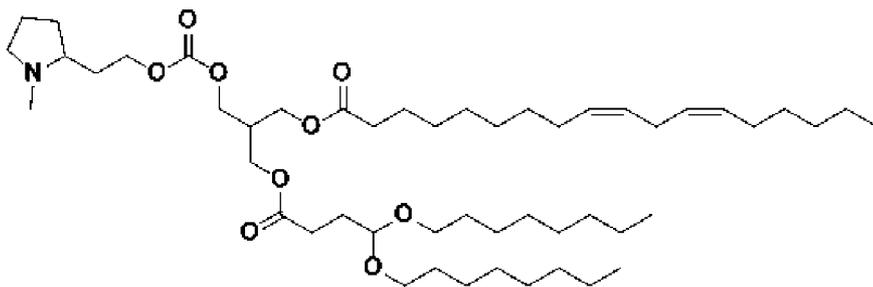
;



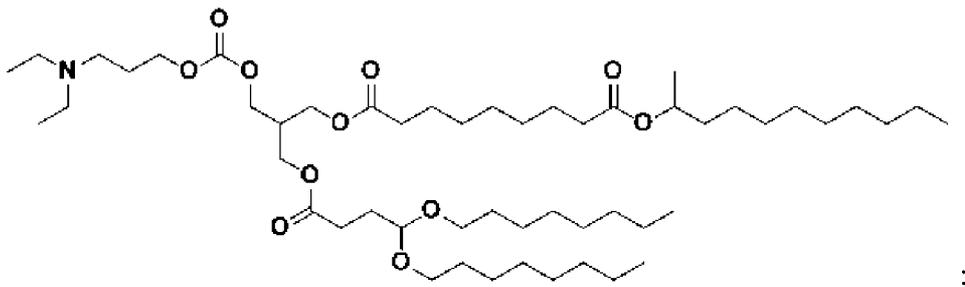
;



;

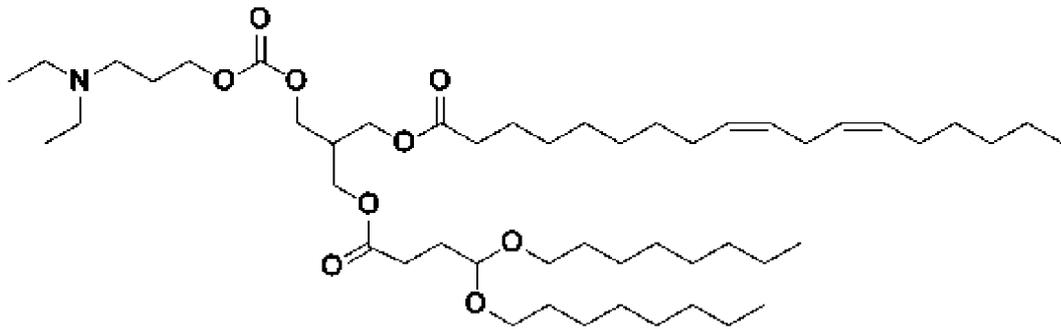
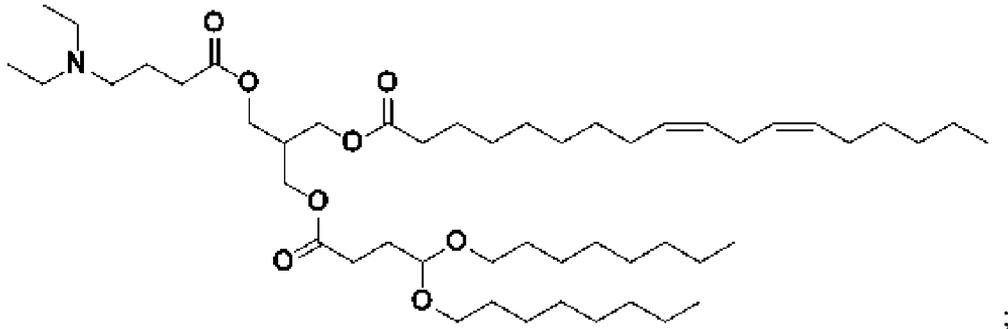


; или

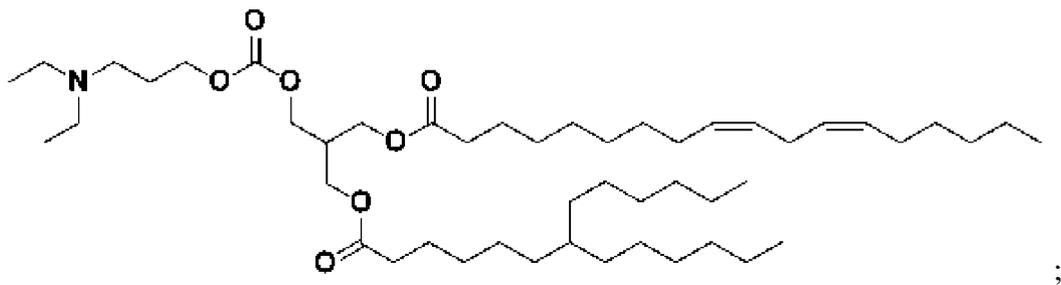


или его соль.

5. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что ионизируемый липид представляет собой

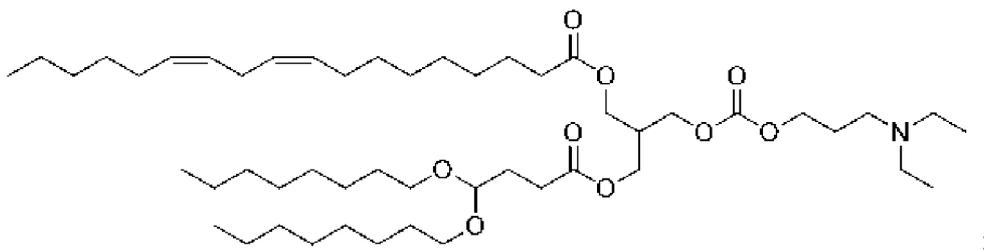


; или



или его соль.

6. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что ионизируемый липид представляет собой



или его соль.

7. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что нейтральный липид представляет собой незаряженный липид или цвиттерионный липид.

8. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что нейтральный липид представляет собой DSPC или DPME.

9. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что нейтральный липид представляет собой DSPC.

10. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что вспомогательный липид выбран из холестерина, 5-гептадецилрезорцинола и гемисукцината холестерина.

11. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что вспомогательный липид представляет собой холестерин.

12. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что PEG-липид содержит димиристоилглицерин (DMG).

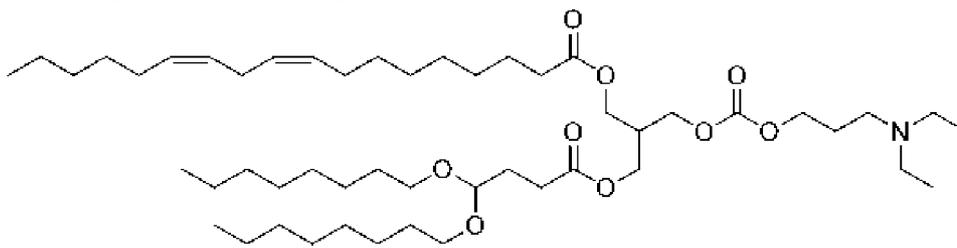
13. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что PEG-липид содержит PEG-2k.

14. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что PEG-липид представляет собой PEG-DMG.

15. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что PEG-липид представляет собой PEG-2k DMG.

16. Липидная композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что PEG-липид представляет собой 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

17. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что 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.

18. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет от около 29-38 моль % от липидного компонента.

19. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет от около 30-43 моль % от липидного компонента.

20. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет от около 25-34 моль % от липидного компонента.

21. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет около 33 моль % от липидного компонента.

22. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что количество нейтрального липида составляет от около 11-20 моль % от липидного компонента.

23. Липидная композиция по любому из пп. 1-21, отличающаяся тем, что количество нейтрального липида составляет около 15 моль % от липидного компонента.

24. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что количество вспомогательного липида составляет от около 43-65 моль % от липидного компонента.

25. Липидная композиция по любому из пп. 1-23, отличающаяся тем, что количество вспомогательного липида составляет от около 43-55 моль % от липидного компонента.

26. Липидная композиция по любому из пп. 1-23, отличающаяся тем, что количество вспомогательного липида составляет около 49 моль % от липидного компонента.

27. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что количество PEG-липидов составляет от около 2,0-3,5 моль % от липидного компонента.

28. Липидная композиция по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что количество PEG-липидов составляет от около 2,3-3,5 моль % от липидного компонента.

29. Липидная композиция по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что количество PEG-липидов составляет от около 2,3-2,7 моль % от липидного компонента.

30. Липидная композиция по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что количество PEG-липидов составляет около 2,7 моль % от липидного компонента.

31. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет от около 29-44 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет от около 11-28 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет от около 28-55 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет от около 2,3-3,5 моль % от липидного компонента.

32. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет от около 29-38 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет от около 11-20 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет от около 43-55 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет от около 2,3-2,7 моль % от липидного компонента.

33. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет от около 25-34 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет от около 10-20 моль % от липидного компонента; количество вспомогательного липида составляет от около 45-65 моль % от липидного компонента; количество PEG-липидов составляет от около 2,5-3,5 моль % от липидного компонента.

34. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет около 30-43 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет около 10-17 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет около 43,5-56 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет около 1,5-3 моль % от липидного компонента.

35. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет около 33 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет около 15 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет около 49 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет около 3 моль % от липидного компонента.

36. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет около 32,9 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет около 15,2 моль % от липидного компонента; количество вспомогательного липида составляет около 49,2 моль % от липидного компонента; количество PEG-липидов составляет около 2,7 моль % от липидного компонента.

37. Липидная композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что количество ионизируемого липида составляет около 35 моль % от липидного компонента; количество нейтрального липида составляет около 15 моль % от липидного компонента, количество вспомогательного липида составляет около 47,5 моль % от липидного компонента, количество PEG-липидов составляет около 2,5 моль % от липидного компонента.

38. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что каждый моль % варьируется менее чем на 5%.

39. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что каждый моль % варьируется менее чем на 1%.

40. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что каждый моль % варьируется менее чем на 0,5%.

41. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что каждый моль % основан на относительных номинальных концентрациях ионизируемого липида, нейтрального липида, вспомогательного липида и PEG-липидов.

42. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся

тем, что каждый моль % основан на относительных фактических концентрациях ионизируемого липида, нейтрального липида, вспомогательного липида и PEG-липидов.

43. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная липидная композиция представляет собой LNP, а Z-средний диаметр LNP составляет менее чем около 145 нм.

44. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная липидная композиция представляет собой LNP, а Z-средний диаметр LNP составляет менее чем около 120 нм.

45. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная липидная композиция представляет собой LNP, а Z-средний диаметр LNP составляет менее чем около 115 нм.

46. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная липидная композиция представляет собой LNP, а Z-средний диаметр LNP составляет менее чем около 100 нм.

47. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная липидная композиция представляет собой LNP, и среднечисловой диаметр LNP составляет более чем около 50 нм.

48. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная липидная композиция представляет собой LNP, и среднечисловой диаметр LNP составляет более чем около 60 нм.

49. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная липидная композиция представляет собой LNP; и LNP имеют индекс полидисперсности от около 0,005 до около 0,75.

50. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная липидная композиция представляет собой LNP; и LNP имеют индекс полидисперсности от около 0,005 до около 0,1.

51. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что соотношение N/P липидной композиции составляет от около 5 до около 7.

52. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что соотношение N/P липидной композиции составляет около 6.

53. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биологически активный агент содержит компонент, не являющийся нуклеиновой кислотой.

54. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биологически активный агент содержит или кодирует терапевтически активный белок.

55. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биологически активный агент содержит или кодирует инструмент геномного редактирования.

56. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся

тем, что биологически активный агент содержит или кодирует одну или большее количество нуклеаз, способных осуществлять одно- или двунитевые разрывы в ДНК или РНК.

57. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биологически активный агент содержит компонент, являющийся нуклеиновой кислотой.

58. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что биологически активный агент содержит РНК.

59. Липидная композиция по п. 58, отличающаяся тем, что РНК представляет собой мРНК.

60. Липидная композиция по п. 59, отличающаяся тем, что компонент, являющийся нуклеиновой кислотой, содержит мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

61. Липидная композиция по п. 60, отличающаяся тем, что мРНК содержит мРНК нуклеазы Cas.

62. Липидная композиция по п. 60, отличающаяся тем, что мРНК содержит мРНК нуклеазы Cas класса 2.

63. Липидная композиция по п. 60, отличающаяся тем, что мРНК содержит мРНК нуклеазы Cas9.

64. Липидная композиция по любому из пунктов 57-63, отличающаяся тем, что компонент, являющийся нуклеиновой кислотой, представляет собой модифицированную РНК.

65. Липидная композиция по любому из пп. 57- 64, отличающаяся тем, что компонент, являющийся нуклеиновой кислотой, содержит нуклеиновую кислоту гидовой РНК.

66. Липидная композиция по п. 65, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота гидовой РНК представляет собой gРНК.

67. Липидная композиция по п. 65 или п. 66, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота гидовой РНК представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (dgРНК).

68. Липидная композиция по п. 65 или п. 66, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота гидовой РНК представляет собой или кодирует одинарную гидовую РНК (sgРНК).

69. Липидная композиция по любому из пп. 66-68, отличающаяся тем, что gРНК представляет собой модифицированную gРНК.

70. Липидная композиция по п. 69, отличающаяся тем, что модифицированная gРНК содержит модификацию в одном или большем количестве из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце.

71. Липидная композиция по пп. 69 или 70, отличающаяся тем, что модифицированная gРНК содержит модификацию в одном или большем количестве из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце.

72. Липидная композиция по любому из пп. 57-71, отличающаяся тем, что компонент, являющийся нуклеиновой кислотой, содержит нуклеиновую кислоту гидовой РНК; мРНК содержит мРНК нуклеазы Cas класса 2; и соотношение мРНК и нуклеиновой кислоты гидовой РНК составляет от около 2:1 до 1:4 по массе.

73. Липидная композиция по п. 72, отличающаяся тем, что соотношение нуклеиновой кислоты гидовой РНК и мРНК нуклеазы Cas класса 2 составляет около 1:1 по массе.

74. Липидная композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что липидная композиция представляет собой композицию LNP.

75. Способ редактирования генов, включающий приведение клетки в контакт с липидной композицией по любому из предшествующих пунктов.

76. Способ по п. 75, отличающийся тем, что редактирование гена приводит к нокауту гена.

77. Способ по п. 75, отличающийся тем, что редактирование гена приводит к коррекции гена.

78. Способ по п. 75, отличающийся тем, что редактирование гена приводит к вставке.

79. Способ расщепления ДНК, включающий приведение клетки в контакт с липидной композицией по любому из пп. 1-74.

80. Способ доставки биологически активного агента в клетку, включающий приведение клетки в контакт с липидной композицией по любому из пп. 1-74.

81. Способ по любому из пп. 75-80, отличающийся тем, что этап приведения клетки в контакт приводит к одноцепочечному разрезу ДНК.

82. Способ по любому из пп. 75-80, отличающийся тем, что этап приведения клетки в контакт приводит к двухцепочечному разрыву ДНК.

83. Способ по любому из пп. 75-82, дополнительно включающий введение в клетку по меньшей мере одной матричной нуклеиновой кислоты.

84. Способ по любому из пп. 75-83, отличающийся тем, что указанный способ включает введение липидной композиции в клетку.

85. Способ по любому из пп. 75-84, отличающийся тем, что липидная композиция представляет собой первую липидную композицию, и способ дополнительно включает приведения клетки в контакт со второй липидной композицией, содержащей одну или большее количество из следующих элементов: мРНК, gРНК и нуклеиновая кислота gРНК.

86. Способ по п. 85 отличающийся тем, что вторая липидная композиция представляет собой вторую липидную композицию по любому из пп. 1-74.

87. Способ по п. 85 или 86, отличающийся тем, что первую и вторую липидную композицию вводят одновременно.

88. Способ по п. 85 или 86, отличающийся тем, что первую и вторую липидную композицию вводят последовательно.

89. Способ по любому из пп. 85-88, отличающийся тем, что первая липидная

композиция содержит первую gРНК, а вторая липидная композиция содержит вторую gРНК, при этом первая и вторая gРНК содержат разные гидовые последовательности, комплементарные разным последовательностям-мишеням.

90. Способ по любому из пп. 75-89, отличающийся тем, что клетка представляет собой эукариотическую клетку.

91. Способ по п. 90, отличающийся тем, что клетка представляет собой клетку человека.

92. Способ по любому из пп. 75-91, отличающийся тем, что клетка пригодна для адоптивной клеточной терапии (АСТ).

93. Способ по п. 92, отличающийся тем, что клетка пригодна для аутологической клеточной терапии.

94. Способ по любому из пп. 75-93, отличающийся тем, что клетка представляет собой стволовую клетку.

95. Способ по п. 94, отличающийся тем, что стволовая клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (HSC) или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC).

96. Способ по любому из пп. 75-95, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой иммунную клетку.

97. Способ по п. 96, отличающийся тем, что иммунная клетка представляет собой лейкоцит или лимфоцит.

98. Способ по п. 96, отличающийся тем, что иммунная клетка представляет собой лимфоцит.

99. Способ по п. 98, отличающийся тем, что лимфоцит представляет собой Т-клетку, В-клетку или NK-клетку.

100. Способ по п. 98, отличающийся тем, что лимфоцит представляет собой Т-клетку.

101. Способ по п. 98, отличающийся тем, что лимфоцит представляет собой активированную Т-клетку.

102. Способ по п. 98, отличающийся тем, что лимфоцит представляет собой неактивированную Т-клетку.

103. Способ по любому из пп. 75-102, отличающийся тем, что клетка контактирует с липидной композицией *in vitro*.

104. Способ по любому из пп. 75-103, отличающийся тем, что клетка контактирует с липидной композицией *ex vivo*.

105. Способ по любому из пп. 75-104, отличающийся тем, что способ включает приведение в контакт ткани животного с липидом.

106. Способ по любому из пп. 75-105, отличающийся тем, что способ включает введение липидной композиции животному.

107. Способ по п. 104 или п. 106, отличающийся тем, что животное представляет собой человека.

108. Способ по любому из пп. 75-107, отличающийся тем, что липидная композиция содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию Т-клеточного рецептора, МНС класса I или МНС класса II.

109. Способ по п. 108, отличающийся тем, что липидная композиция содержит gРНК, нацеленную на TRAC.

110. Способ по п. 108, отличающийся тем, что липидная композиция содержит gРНК, нацеленную на TRBC.

111. Способ по п. 108, отличающийся тем, что липидная композиция содержит gРНК, нацеленную на СПТА.

112. Способ по п. 108, отличающийся тем, что липидная композиция содержит gРНК, нацеленную на HLA-A.

113. Способ по п. 108, отличающийся тем, что липидная композиция содержит gРНК, нацеленную на HLA-B.

114. Способ по п. 108, отличающийся тем, что липидная композиция содержит gРНК, нацеленную на HLA-C.

115. Способ по п. 108, отличающийся тем, что липидная композиция содержит gРНК, нацеленную на B2M.

116. Способ получения множественных редактирований генома в клетке, включающий

приведение клетки в контакт *in vitro* по меньшей мере с первой липидной композицией по любому из пп. 1-74 и второй липидной композицией по любому из пп. 1-74,

при этом биологически активный агент первой липидной композиции содержит первую гидовую РНК (gРНК), направленную на первую целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома, и

биологически активный агент второй липидной композиции содержит вторую gРНК, направленную на вторую целевую последовательность и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома

таким образом, в клетке получают множественные редактирования генома.

117. Способ по п. 116, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с третьей липидной композицией по любому из пп. 1-74, при этом биологически активный агент третьей липидной композиции содержит третью gРНК, направленную на третью целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома.

118. Способ по п. 117, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с четвертой липидной композицией по любому из пп. 1-74, при этом биологически активный агент четвертой липидной композиции содержит четвертую gРНК, направленную на четвертую последовательность и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома.

119. Способ по п. 118, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с

пятой липидной композицией по любому из пп. 1-74, при этом биологически активный агент пятой липидной композиции содержит пятую gРНК, направленную на пятую целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома.

120. Способ по п. 119, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с шестой липидной композицией по любому из пп. 1-74, при этом биологически активный агент шестой липидной композиции содержит шестую gРНК, направленную на шестую целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома.

121. Способ по любому из пп. 116-120, отличающийся тем, что клетка контактирует по меньшей мере с одной липидной композицией, содержащей инструмент редактирования генома.

122. Способ по п. 121, отличающийся тем, что инструмент редактирования генома содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

123. Способ по любому из пп. 116-122, отличающийся тем, что клетка дополнительно контактирует с донорной нуклеиновой кислотой для вставки в целевую последовательность, необязательно при этом донорная нуклеиновая кислота представлена в виде вектора.

124. Способ по любому из пп. 116-123, отличающийся тем, что липидные композиции вводят последовательно.

125. Способ по любому из пп. 116-123, отличающийся тем, что по меньшей мере две липидные композиции вводят одновременно.

126. Способ по любому из пп. 116-125, отличающийся тем, что клетка представляет собой эукариотическую клетку.

127. Способ по п. 126, отличающийся тем, что клетка представляет собой клетку человека.

128. Способ по любому из пунктов 116-127, отличающийся тем, что клетка пригодна для адоптивной клеточной терапии (АСТ).

129. Композиция по п. 128, отличающаяся тем, что клетка пригодна для адоптивной клеточной терапии.

130. Способ по любому из пп. 116-129, отличающийся тем, что клетка представляет собой стволовую клетку.

131. Способ по п. 130, отличающийся тем, что стволовая клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (HSC) или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC).

132. Способ по любому из пп. 116-131, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой иммунную клетку.

133. Способ по п. 132, отличающийся тем, что иммунная клетка представляет собой лейкоцит или лимфоцит.

134. Способ по п. 133, отличающийся тем, что иммунная клетка представляет собой лимфоцит.

135. Способ по п. 134, отличающийся тем, что лимфоцит представляет собой Т-клетку, В-клетку или НК-клетку.

136. Способ по п. 132, отличающийся тем, что иммунная клетка выбрана из лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, тучных клеток, дендритных клеток, гранулоцитов, первичных иммунных клеток, CD3+ клеток, CD4+ клеток, CD8+ Т-клеток, регуляторных Т-клеток (Tregs), В-клеток, НК-клеток и дендритных клеток (DC)).

137. Способ по п. 132, отличающийся тем, что клетка представляет собой Т-клетку.

138. Способ по п. 137, отличающийся тем, что клетка представляет собой активированную Т-клетку.

139. Способ по п. 137, отличающийся тем, что клетка представляет собой неактивированную Т-клетку.

140. Способ по п. 123, отличающийся тем, что клетка представляет собой Т-клетку, а донорная нуклеиновая кислота включает участки, имеющие гомологию с соответствующими участками последовательности рецептора Т-клетки.

141. Способ по любому из пп. 116-140, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC.

142. Способ по любому из пп. 116-141, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC.

143. Способ по любому из пп. 116-142, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса I.

144. Способ по любому из пп. 116-143, отличающийся тем, что одна из липидных композиций включает gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса II.

145. Способ по любому из пп. 116-144, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC.

146. Способ по любому из пп. 116-145, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на HLA-A, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СПТА.

147. Способ по любому из пп. 116-145, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на HLA-A, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса II.

148. Способ по любому из пп. 116-145, отличающийся тем, что одна из липидных

композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса I, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СИТА.

149. Способ по любому из пп. 116-145, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию рецептора Т-клеток, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на HLA-A, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СИТА.

150. Способ по любому из пп. 116-145, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на HLA-A, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СИТА.

151. Способ по любому из пп. 116-145, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию рецептора Т-клеток, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса I, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СИТА.

152. Способ по любому из пп. 116-151, дополнительно включающий размножение клеток *in vitro*.

153. Способ получения множественных редактирований генома в популяции клеток, включающий этапы:

а) приведение популяции клеток в контакт *in vitro* по меньшей мере с первой липидной композицией по любому из пп. 1-74 и второй липидной композицией по любому из пп. 1-74,

при этом биологически активный агент первой липидной композиции содержит первую гидовую РНК (gРНК), направленную на первую целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома, и

биологически активный агент второй липидной композиции содержит вторую gРНК, направленную на вторую целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома;

таким образом, получают множественные редактирования генома в популяции клеток.

154. Способ по п. 153, дополнительно включающий приведение в контакт популяции клеток с третьей липидной композицией по любому из пп. 1-74, отличающийся тем, что биологически активный агент третьей липидной композиции содержит третью gРНК, направленную на третью целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома.

155. Способ по п. 154, дополнительно включающий приведение в контакт популяции клеток с четвертой липидной композицией по любому из пп. 1-74,

отличающийся тем, что биологически активный агент четвертой липидной композиции содержит четвертую gРНК, направленную на четвертую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома.

156. Способ по п. 155, дополнительно включающий приведение в контакт популяции клеток с пятой липидной композицией по любому из пп. 1-74, отличающийся тем, что биологически активный агент пятой липидной композиции содержит пятую gРНК, направленную на пятую целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома.

157. Способ по п. 156, дополнительно включающий приведение в контакт популяции клеток с шестой липидной композицией по любому из пп. 1-74, отличающийся тем, что биологически активный агент шестой липидной композиции содержит шестую gРНК, направленную на шестую целевую последовательность, и необязательно нуклеиновую кислоту инструмента редактирования генома.

158. Способ по любому из пп. 153-157, отличающийся тем, что популяция клеток контактирует по меньшей мере с одной липидной композицией, содержащей инструмент редактирования генома.

159. Способ по п. 158, отличающийся тем, что инструмент редактирования генома содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

160. Способ по любому из пп. 153-159, отличающийся тем, что популяция клеток дополнительно контактирует с донорной нуклеиновой кислотой для вставки в целевую последовательность, необязательно при этом донорная нуклеиновая кислота представлена в виде вектора.

161. Способ по любому из пп. 153-160, отличающийся тем, что липидные композиции вводят последовательно.

162. Способ по любому из пп. 153-160, отличающийся тем, что по меньшей мере две липидные композиции вводят одновременно.

163. Способ по любому из пп. 153-162, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию эукариотических клеток.

164. Способ по п. 163, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию клеток человека.

165. Способ по любому из пунктов 153-164, отличающийся тем, что популяция клеток пригодна для адоптивной клеточной терапии (АСТ).

166. Способ по п. 165, отличающийся тем, что популяция клеток пригодна для аутологической клеточной терапии.

167. Способ по любому из пп. 153-166, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию стволовых клеток.

168. Способ по п. 167, отличающийся тем, что популяция стволовых клеток представляет собой популяцию гемопоэтических стволовых клеток (HSC) или популяцию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC).

169. Способ по любому из пп. 153-168, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию иммунных клеток.

170. Способ по п. 169, отличающийся тем, что популяция иммунных клеток представляет собой популяцию лейкоцитов или популяцию лимфоцитов.

171. Способ по п. 170, отличающийся тем, что популяция иммунных клеток представляет собой популяцию лимфоцитов.

172. Способ по п. 171, отличающийся тем, что популяция лимфоцитов представляет собой популяцию Т-клеток, популяцию В-клеток или популяцию НК-клеток.

173. Способ по п. 169, отличающийся тем, что иммунные клетки выбраны из лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, тучных клеток, дендритных клеток, гранулоцитов, первичных иммунных клеток, CD3+ клеток, CD4+ клеток, CD8+ Т-клеток, регуляторных Т-клеток (Treg), В-клеток, НК-клеток и дендритных клеток (DC)).

174. Способ по п. 169, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию Т-клеток.

175. Способ по п. 174, отличающийся тем, что клетки представляют собой активированные Т-клетки.

176. Способ по п. 174, отличающийся тем, что клетки представляют собой неактивированные Т-клетки.

177. Способ по п. 160, отличающийся тем, что популяция клеток представляет собой популяцию Т-клеток, а донорная нуклеиновая кислота включает участки, имеющие гомологию с соответствующими участками последовательности рецептора Т-клеток.

178. Способ по любому из пп. 153-177, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC.

179. Способ по любому из пп. 153-178, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC.

180. Способ по любому из пп. 153-179, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса I.

181. Способ по любому из пп. 153-180, отличающийся тем, что одна из липидных композиций включает gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса II.

182. Способ по любому из пп. 153-181, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC.

183. Способ по любому из пп. 153-182, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на HLA-A, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СПТА.

184. Способ по любому из пп. 153-182, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на HLA-A, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса II.

185. Способ по любому из пп. 153-182, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRBC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса I, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СИТА.

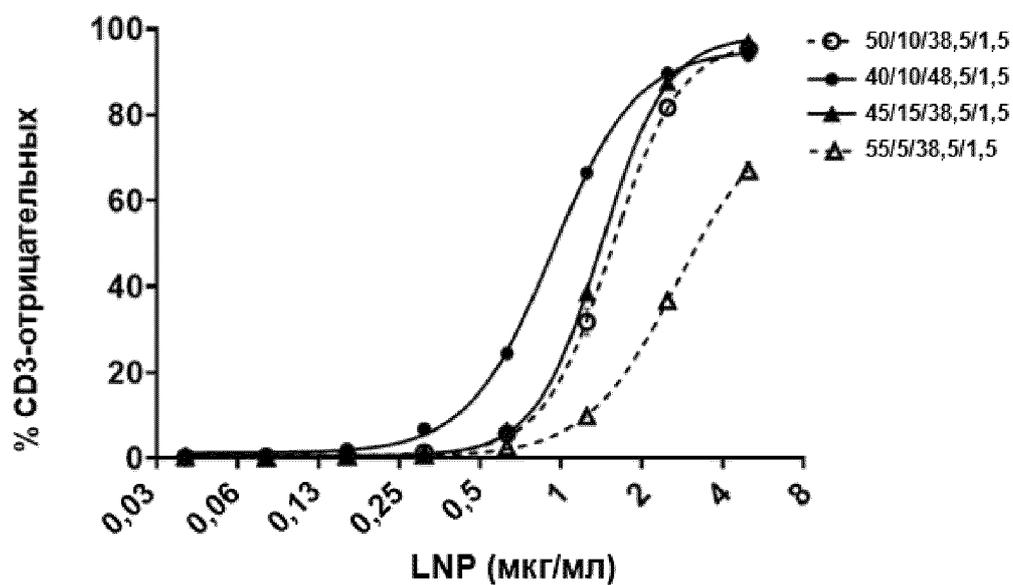
186. Способ по любому из пп. 153-182, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию рецептора Т-клеток, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на HLA-A, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СИТА.

187. Способ по любому из пп. 153-182, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на TRAC, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на HLA-A, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СИТА.

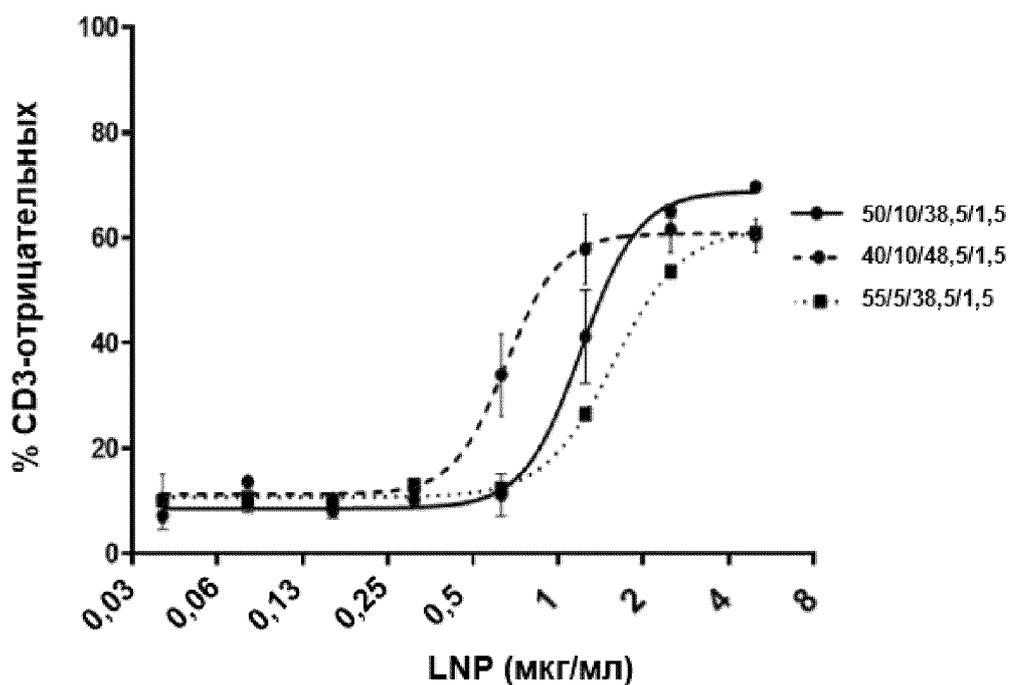
188. Способ по любому из пп. 153-182, отличающийся тем, что одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию рецептора Т-клеток, одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на ген, который снижает или устраняет поверхностную экспрессию МНС класса I, и одна из липидных композиций содержит gРНК, нацеленную на СИТА.

189. Способ по любому из пп. 153-188, дополнительно включающий размножение популяции клеток *in vitro*.

По доверенности

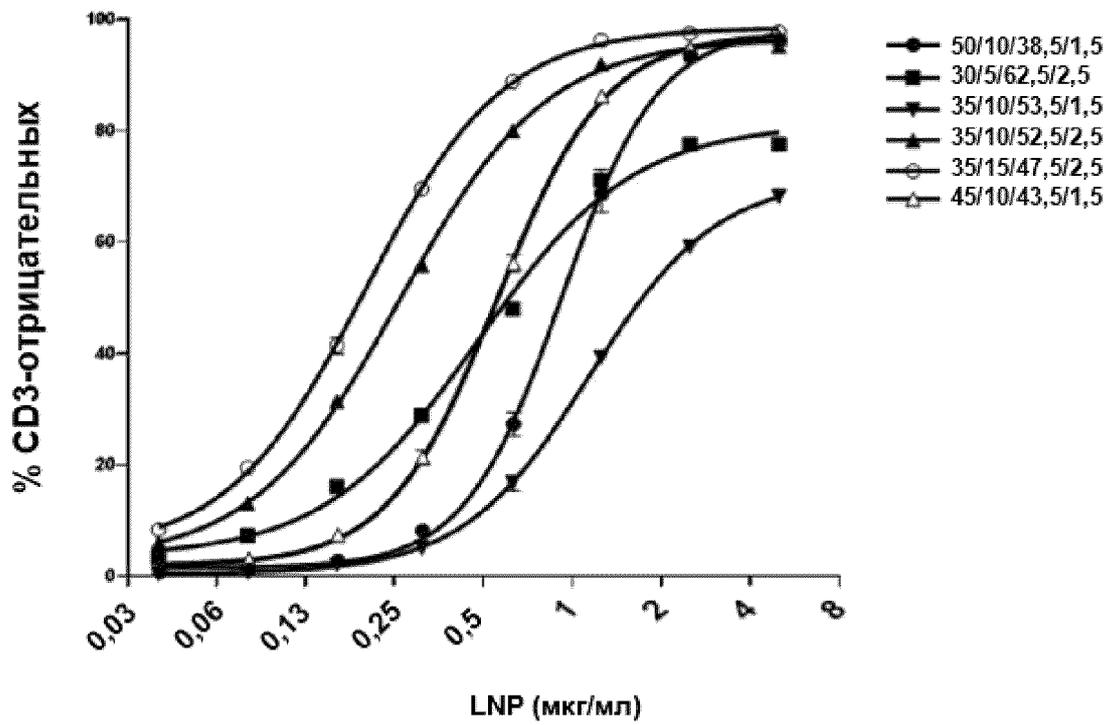


Фиг. 1А

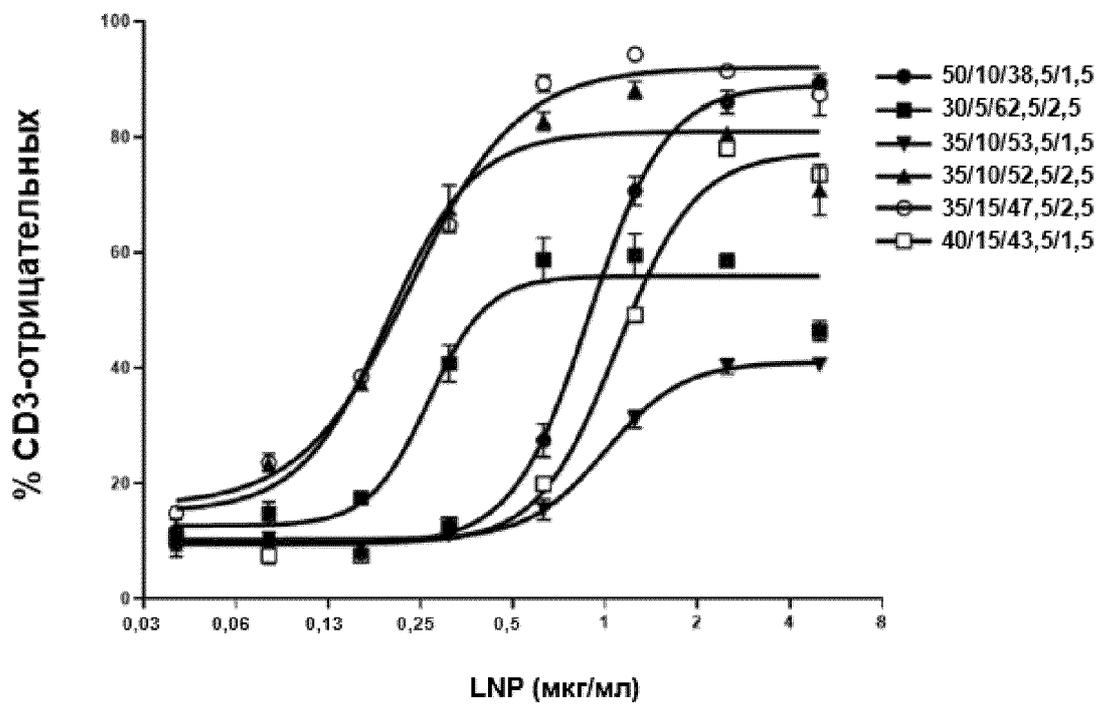


Фиг. 1В

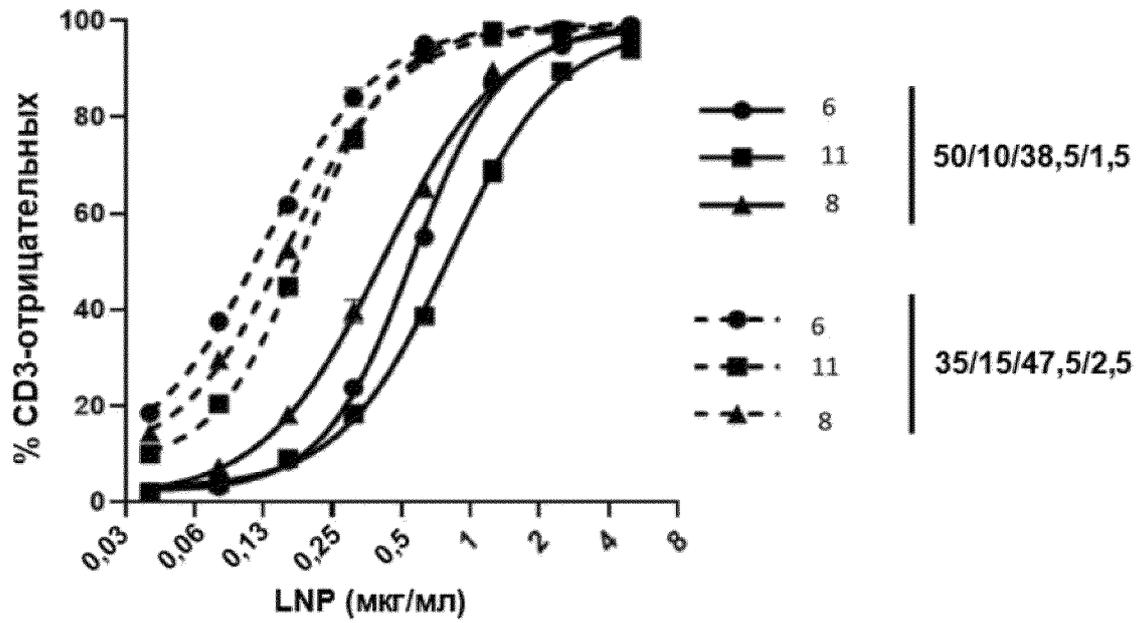
2/10



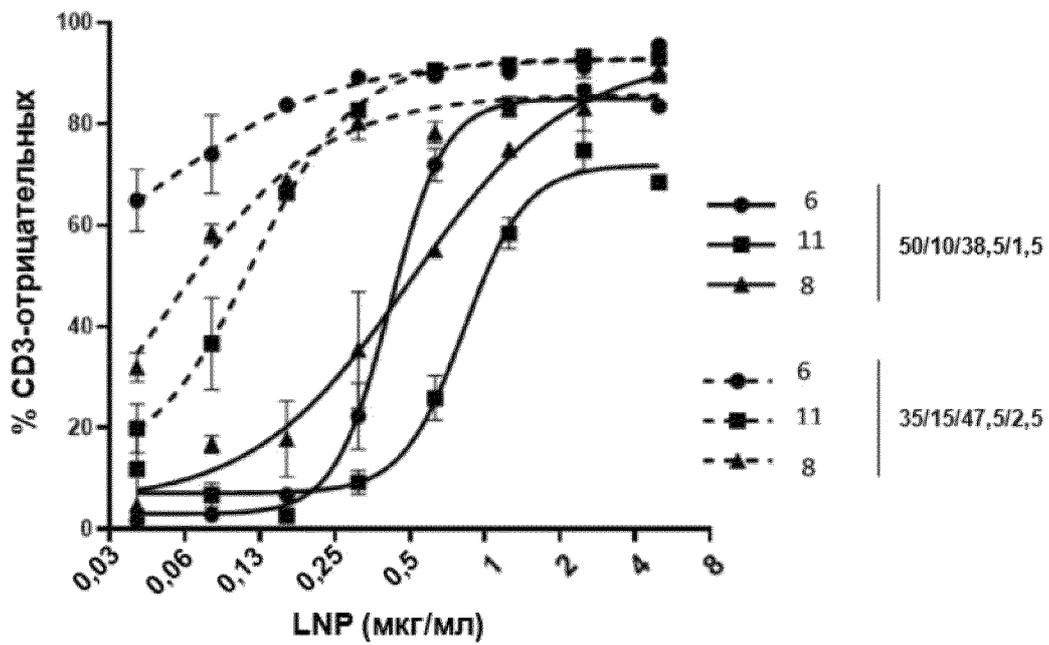
Фиг. 2А



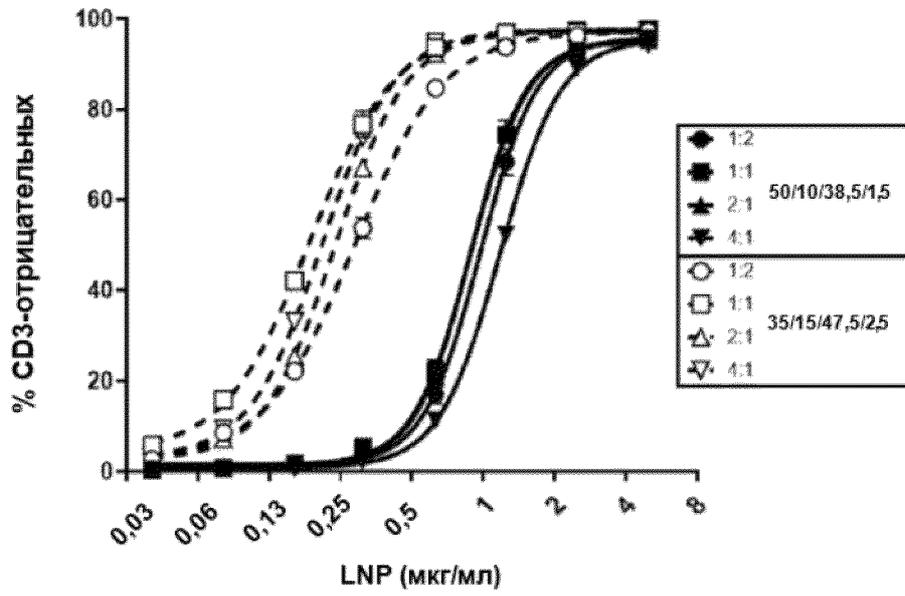
Фиг. 2В



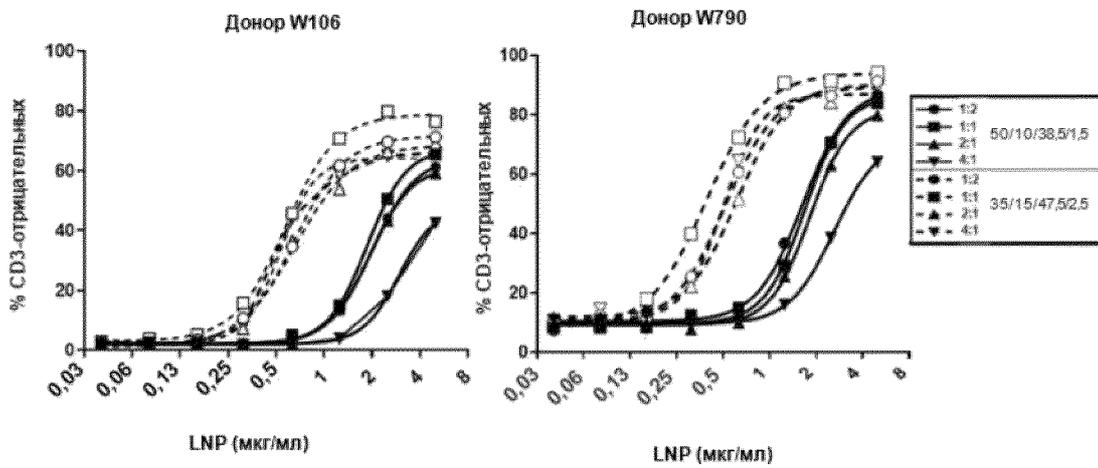
Фиг. 3А



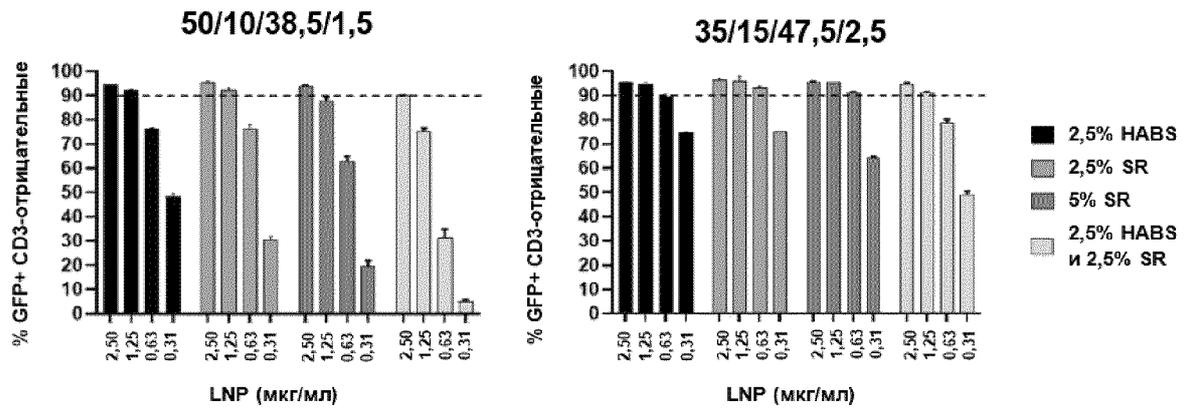
Фиг. 3В



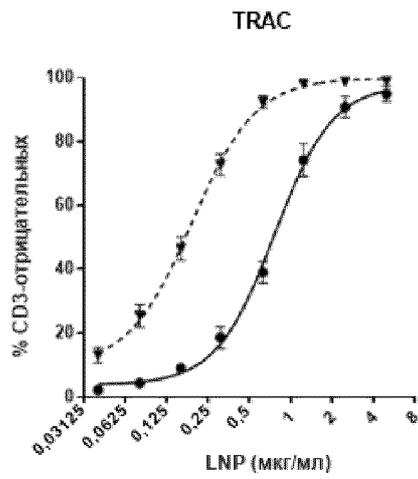
Фиг. 4А



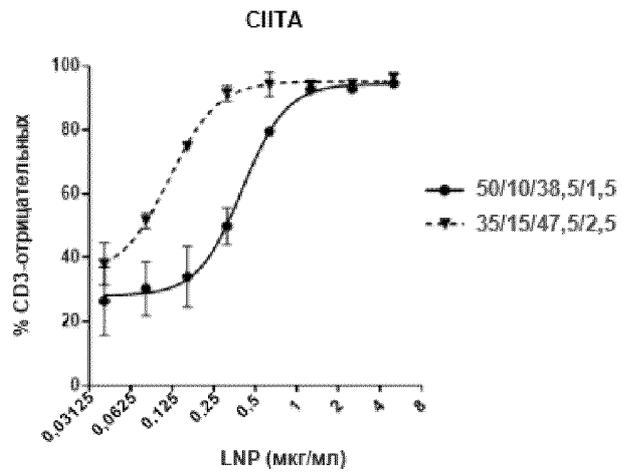
Фиг. 4В



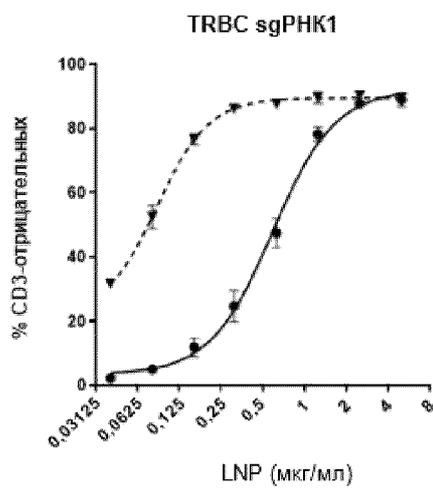
Фиг. 5



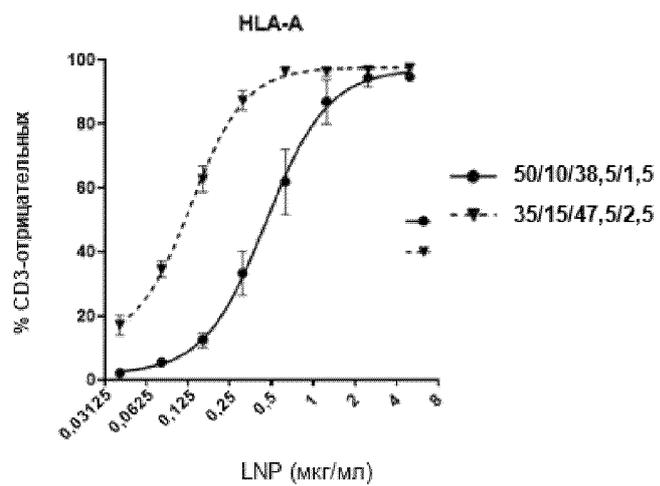
Фиг. 6А



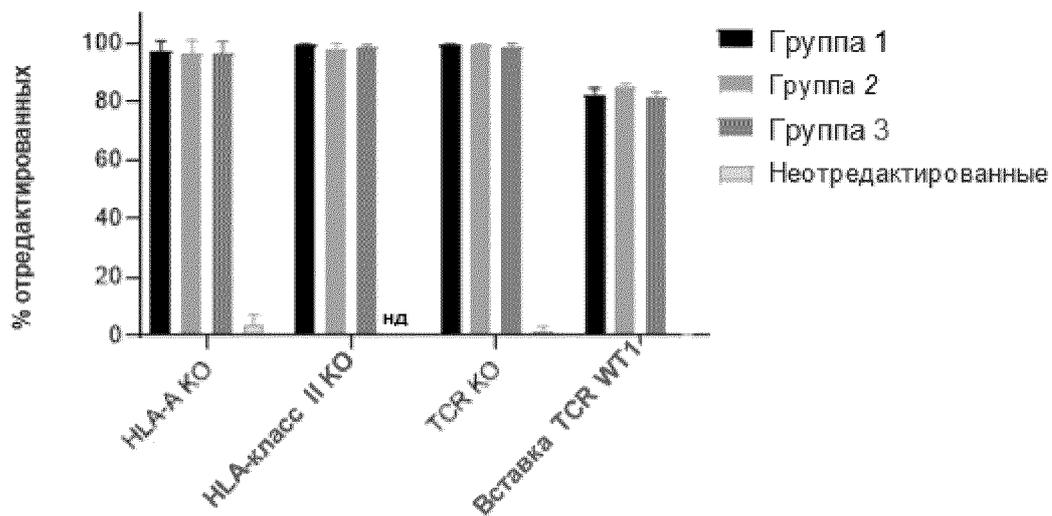
Фиг. 6В



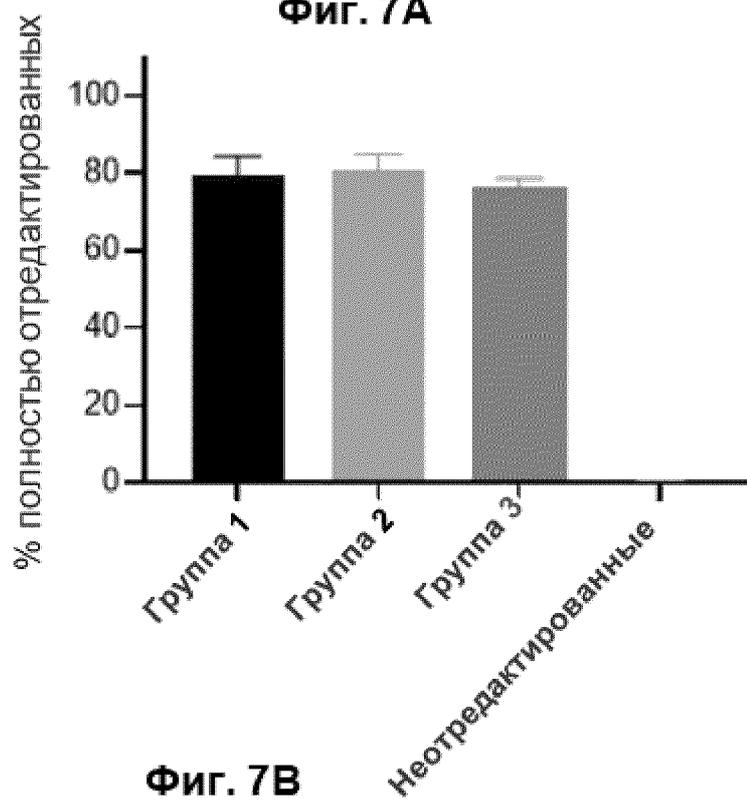
Фиг. 6С



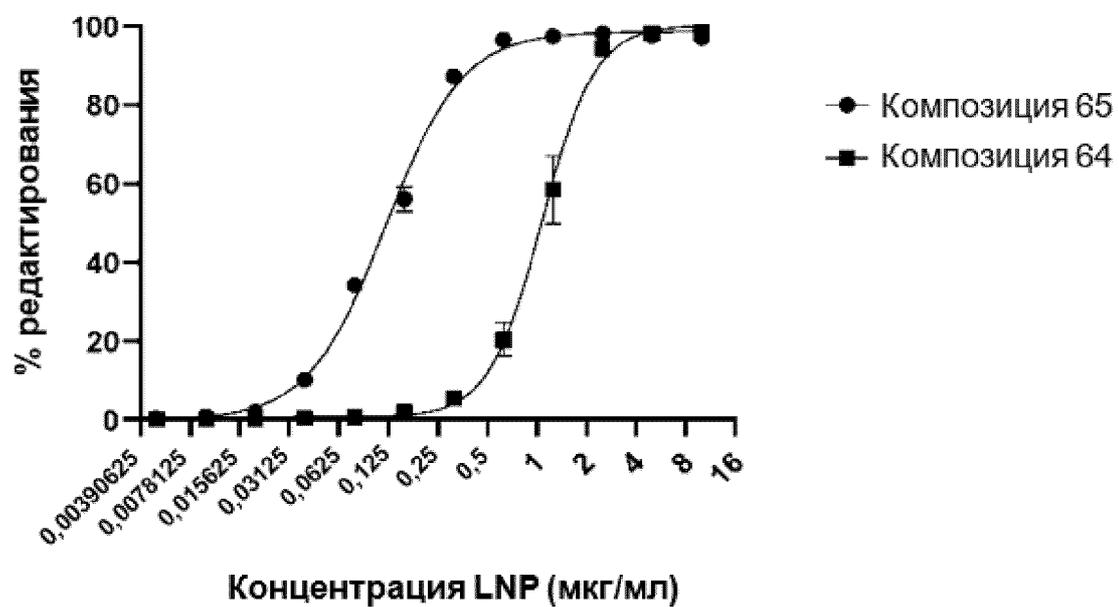
Фиг. 6D



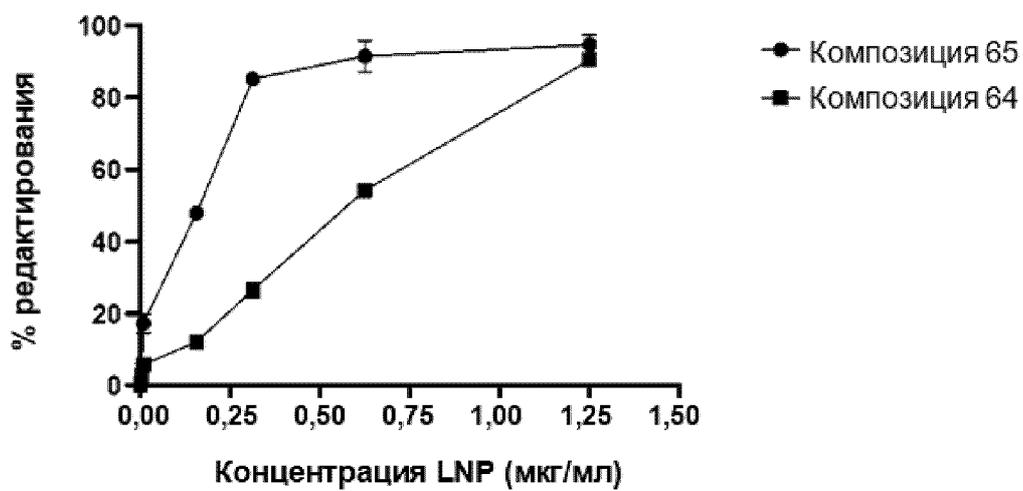
Фиг. 7А



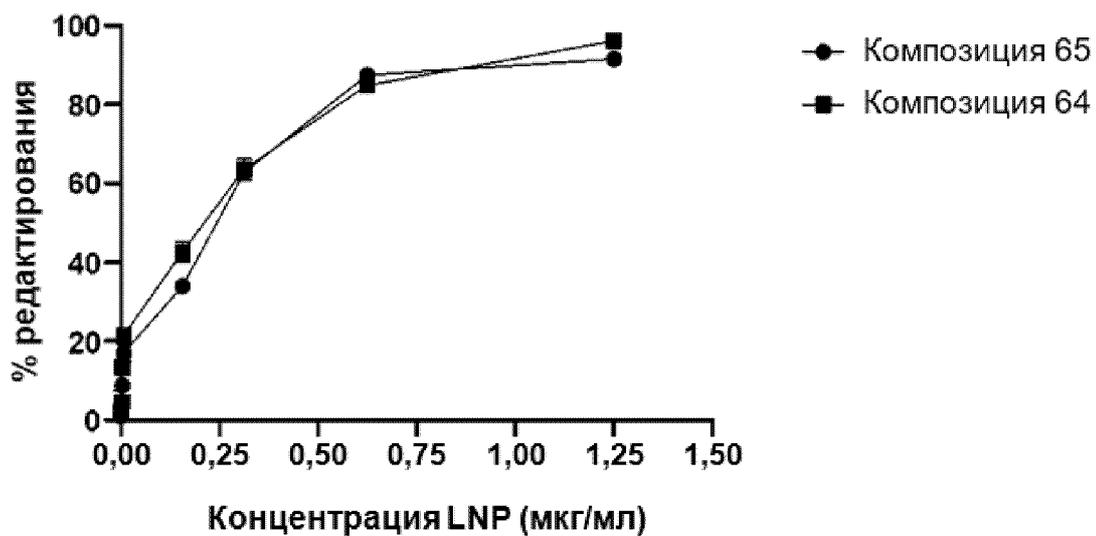
Фиг. 7В



Фиг. 8

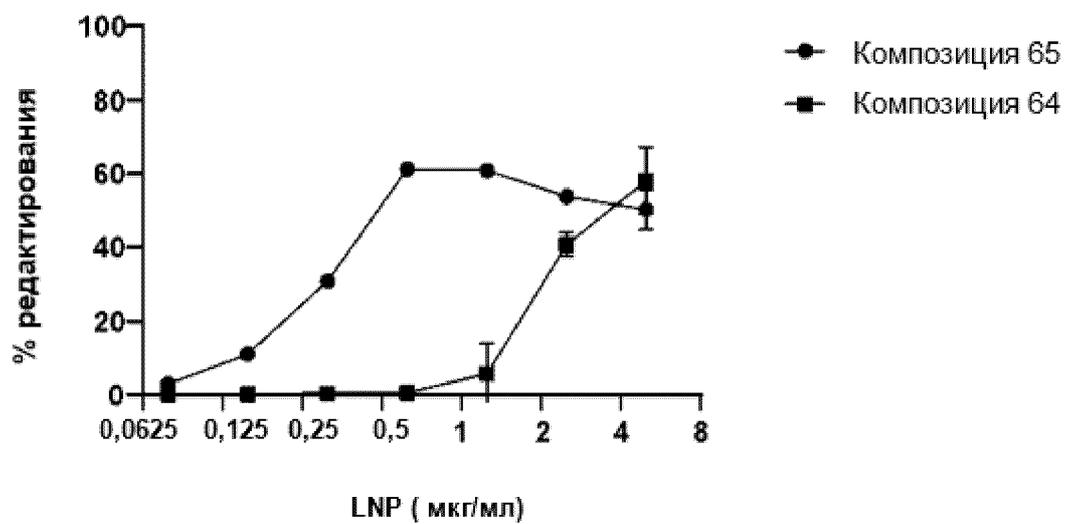


Фиг. 9А



Фиг. 9В

10/10



Фиг. 10