

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490888 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.01

(22) Дата подачи заявки
2022.09.30

(51) Int. Cl. *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07C 215/08 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ (LNP) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/251,255; 63/290,220

(32) 2021.10.01; 2021.12.16

(33) US

(86) PCT/US2022/077346

(87) WO 2023/056418 2023.04.06

(71) Заявитель:
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:
Митчелл Майкл, Патель Саван,
Биллингсли Маргарет М., Хан
Сюэсян, Чжан Ханьвэнь (US)

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

(57) Настоящее изобретение частично относится к липидным наночастицам (LNP), содержащим заменители холестерина (т.е. аналоги и/или производные холестерина), и способам их применения для доставки *in vivo* молекул нуклеиновой кислоты и/или терапевтических агентов в клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты кодируют химерные антигенные рецепторы (CAR). В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению обладают противовоспалительным действием. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к применению LNP, описанных в настоящем документе, для лечения, профилактики и/или облегчения заболеваний и/или нарушений у субъекта, включающих, но не ограниченных ими, рак.



A1

202490888

202490888

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581195EA/55

КОМПОЗИЦИИ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ (LNP) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно § 119(e) раздела 35 USC предварительной заявки на патент США № 63/290,220, поданной 16 декабря 2021 г., и предварительной заявки на патент США № 63/251,255, поданной 1 октября 2021 г., обе эти заявки полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ФЕДЕРАЛЬНО СПОНСИРУЕМЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ИЛИ РАЗРАБОТКАХ

Настоящее изобретение было создано при государственной поддержке в рамках TR002776, предоставленной Национальными институтами здравоохранения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

За последнее десятилетие, иммунотерапия стала важнейшим инструментом лечения различных заболеваний и состояний. Эти терапии таргетируют иммунные клетки (*например*, Т-клетки, В-клетки и дендритные клетки, *среди прочего*), которые являются частью сложного набора биологических сетей, которые контролируют ответ организма на рак, чужеродные патогены и другие раздражители. Иммунотерапия охватывает широкий спектр методов, от ингибиторов на основе антител до генетически сконструированных иммунных клеток. Иммунотерапия на основе информационной РНК, один из методов, вызвала значительный интерес из-за временного характера информационной РНК (иРНК) и снижения риска геномной интеграции, связанной с ДНК. Ионизируемые липидные наночастицы (LNP) являются наиболее клинической передовой невирусной платформой для доставки РНК-терапевтических агентов, о чем свидетельствует клинический успех Onpattro и Pfizer/BioNTech и Moderna иРНК-вакцин от COVID-19. Ионизируемые липиды могут защищать и доставлять терапевтические иРНК к клеткам-мишеням, преодолевая биологические барьеры.

Однако комплекс LNP/иРНК может взаимодействовать с врожденной иммунной системой и запускать иммунные ответы. Хотя иРНК можно модифицировать так, чтобы они были иммунно-молчащими, было показано, что сами LNP вызывают сильные воспалительные ответы в иммунных клетках. LNP могут активировать иммунную систему путем взаимодействия с рецепторами распознавания структур (PRR) на антигенпрезентирующих клетках (APC), такими как toll-подобные рецепторы (TLR). Предыдущие исследования показали, что взаимодействие LNP с PRR впоследствии запускает высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), позволяя предположить общее начало врожденного иммунного ответа. Воспалительные ответы могут затем снизить эффективность трансляции иРНК и спровоцировать побочные эффекты, связанные с иммунной системой. Таким образом, для

терапии иРНК на основе LNP в клинике необходима премедикация противовоспалительными лекарственными средствами и антигистаминами.

Кроме того, известной технологией доставки иРНК в иммунные клетки является электропорация, которая представляет собой способ, при котором клеточные мембраны пермеабилзируют с помощью электрических импульсов, что позволяет трансдукцию иРНК в цитозоль. Однако электропорация клеток в условиях *ex vivo* имеет тенденцию быть высокотоксичной для клеток-мишеней. Кроме того, электропорация ограничена применением *ex vivo*, что затрудняет трансляцию иРНК иммунотерапии на платформы *in vivo*.

Таким образом, в данной области техники существует потребность в LNP, которые могут и подавлять нежелательные врожденные иммунные ответы, и эффективно доставлять груз иРНК с низкой токсичностью к иммунным клеткам способом, который позволяет применять их *in vivo*. Настоящее изобретение направлено на эти потребности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает липидную наночастицу (LNP). В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один ионизируемый липид, при этом ионизируемый липид составляет от около 10% моль до около 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один хелперный липид, при этом хелперный липид составляет от около 10% моль до около 45% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из холестерина и заменителя холестерина, при этом комбинация холестерина и заменителя холестерина составляет от около 5% моль до около 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит по меньшей мере один полиэтиленгликоль (PEG) или PEG-конъюгированный липид, при этом PEG или PEG-конъюгированный липид составляет от около 0,5% моль до около 12,5% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, LNP дополнительно содержит по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты и терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой иРНК.

В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является дексаметазон.

В некоторых вариантах осуществления, заменитель холестерина выбран из группы, состоящей из 7- α -гидроксихолестерина, 7- β -гидроксихолестерина, 19-гидроксихолестерина, 20-(S)-гидроксихолестерина, 24-(S)-гидроксихолестерина, 25-гидроксихолестерина, 7-кетохолестерина, 5,6-эпоксихолестерина, 3 β ,5 α ,6 β -тригидроксихолестерина, 4 β -гидроксихолестерина, 27-гидроксихолестерина и 22-(R)-гидроксихолестерина.

В некоторых вариантах осуществления, заменитель холестерина выбран из группы, состоящей из хенодезоксихолевой кислоты (CDCA), холевой кислоты (CA), дезоксихолевой кислоты (DCA), литохолевой кислоты (LCA), таурохолевой кислоты,

гликохолевой кислоты, таурохенодезоксихолевой кислоты и гликохенодезоксихолевой кислоты.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одну LNP по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой вакцину.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способ доставки по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты и терапевтического агента, в клетку-мишень у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одной LNP по настоящему изобретению и/или по меньшей мере одной фармацевтической композиции по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, способ лечит, предотвращает и/или облегчает по меньшей мере одно заболевание, выбранное из группы, состоящей из вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, паразитарной инфекции, рака или заболевания или нарушения, связанного с раком.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Чертежи в целом иллюстрируют, в качестве примера, но не в качестве ограничения, различные варианты осуществления настоящей заявки.

На ФИГ. 1А-1В изображены химические структуры холестерина и дексаметазона, а также схематическая иллюстрация противовоспалительного действия LNP для уменьшения побочных эффектов и улучшения трансфекции иРНК. На ФИГ. 1А изображены химические структуры холестерина (слева, ММ: 386,65 г/моль) и дексаметазона (справа, ММ: 392,47 г/моль). На ФИГ. 1В представлены показательные данные, демонстрирующие, что противовоспалительные LNP подавляют местное воспаление, вызванное LNP в иммунных клетках, что приводит к снижению побочных эффектов и усилению трансфекции иРНК в печени. Предполагается, что LNP стимулируют иммунные клетки (*например*, макрофаги). В некоторых вариантах осуществления, дексаметазон (*т.е.* Dex) может снижать высвобождение провоспалительных цитокинов (*например*, TNF- α) и, таким образом, улучшать печеночную трансфекцию и минимизировать неблагоприятные эффекты LNP.

На ФИГ. 2 изображена типовая диаграмма, показывающая составление LNP с добавлением Dex посредством микрофлюидного смешивания. В некоторых вариантах осуществления, иРНК растворяют в водной фазе, тогда как PEG-конъюгированный липид (*например*, C14PEG-2000), MC3, DSPC, холестерин и дексаметазон растворяют в органической фазе. В некоторых вариантах осуществления, два раствора быстро смешивают в микрофлюидном устройстве с образованием иРНК-LNP.

На ФИГ. 3А-3В изображен гидродинамический размер неограничивающих LNP настоящего изобретения, измеренный способом динамического рассеяния света (ДРС). На ФИГ. 3А показано распределение C10D0 LNP по размерам на основе интенсивности. На

ФИГ. 3В показано распределение C9D1 LNP по размерам на основе интенсивности. Показаны три типовых результата технического повтора для каждой LNP.

На ФИГ. 4А-4С изображены типовые экспериментальные данные, демонстрирующие экспрессию люциферазы *in vitro* и жизнеспособность клеток в клетках HepG2, и уровни TNF- α в клетках RAW246.7 после обработки типовыми иРНК LNP по настоящему изобретению, содержащими Dex. На ФИГ. 4А изображена трансфекция иРНК люциферазы *in vitro* в клетках HepG2 через 24 часа после обработки. На ФИГ. 4В показана жизнеспособность клеток HepG2 через 24 часа после обработки. На ФИГ. 4С показано продуцирование TNF- α в клетках RAW246.7 через 24 часа после обработки. Данные представлены как среднее \pm СО (n=3). нз, незначительно, ***P<0,001.

На ФИГ. 5А-5В изображены типовые экспериментальные данные, демонстрирующие экспрессию люциферазы *in vitro* и жизнеспособность клеток в клетках HepG2 после обработки типовыми LNP по настоящему изобретению, составленными с различными соотношениями холестерина:дексаметазон (С:D). На ФИГ. 5А изображена трансфекция иРНК люциферазы *in vitro* в клетках HepG2 через 24 часа после обработки. На ФИГ. 5В показана жизнеспособность клеток HepG2 через 24 часа после обработки. Данные представлены как среднее \pm СО (n=3).

На ФИГ. 6А-6В показаны типовые экспериментальные данные, демонстрирующие уровни TNF- α и доставку иРНК *in vivo* после внутривенного введения LNP C10D0 и C9D1. На ФИГ. 6А показаны уровни TNF- α в сыворотке после лечения мышей LNP C10D0 или C9D1. Сыворотку собирают через 20 часов после обработки. Данные представлены как среднее \pm СО (n=3). *P<0,05. b). На ФИГ. 6В изображена экспрессия люциферазы *in vivo*; каждой мышце внутривенно вводят 4 мкг иРНК люциферазы, содержащей LNP.

На ФИГ. 7А-7С изображены мотивация, дизайн и синтез неограничивающих липидных наночастиц (LNP) с замещением гидроксистерина. На ФИГ. 7А схематически изображены компоненты LNP, состав и общая ожидаемая структура. На ФИГ. 7В представлена диаграмма, изображающая доставку LNP в Т-клетку и механизмы эндосомальной направленной миграции с участием белков семейства Rab. В некоторых вариантах осуществления, Rab5, Rab7 и Rab11 связываются с ранними, поздними и рециркулирующими эндосомами, соответственно. На ФИГ. 7С изображена конструкция неограничивающей библиотеки LNP, включающая замену различных гидроксистеринов по меньшей мере частью не модифицированного холестерина.

На ФИГ. 8А-8С изображены типовые экспериментальные данные, демонстрирующие характеристики и стабильность неограничивающих типовых составов LNP по настоящему изобретению, содержащих аналоги холестерина. На ФИГ. 8А изображены структуры шести гидроксистеринов (*например*, 7 α -НС, 7 β -НС, 19-НС, 20(S)-НС, 24(S)-НС и 25-НС), сгруппированных по расположению гидроксильной модификации на молекулу холестерина. LNP, содержащие холестерин, модифицированный в любом положении полициклического ядра (*т.е.* «тела» молекулы), обозначены буквой «А» (*т.е.* А1, А2, А3), и LNP, содержащие модификации холестерина в

заместителе алкильной цепи 5-членного кольца холестерина (*т.е.* «хвоста» молекулы) обозначены буквой «В» (*т.е.* В1, В2, В3). На ФИГ. 8В изображены измерения z-среднего диаметра, PDI, концентрации иРНК и эффективности инкапсулирования для составов S2 LNP и LNP со 100% заменой холестерина, проведенных в течение 28 дней для оценки стабильности LNP. Кривые выборки ДРС показывают типовые распределения размеров составов LNP S2 и A1-100 на 3 день. $n=3$. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение. На ФИГ. 8С изображены измерения рКа, дзета-потенциала, z-среднего диаметра и PDI для типовых LNP настоящего изобретения. $n=3$. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение.

На ФИГ. 9А-9В изображен скрининг библиотеки LNP для доставки (ФИГ. 9А) и жизнеспособности (ФИГ. 9В) иРНК люциферазы в линии Т-клеток (Jurkat) для идентификации лучших составов. Клетки Jurkat обрабатывают составами LNP в концентрации 60 нг иРНК/60000 клеток в течение 24 часов. Экспрессию люциферазы нормализуют для клеток, обработанных стандартным составом LNP (S2), и фоновую люминесценцию вычитают. Процент жизнеспособности клеток, обработанных LNP, определяют путем нормализации к необработанным клеткам. Легенда обозначает процентное замещение каждого заместителя гидроксистерина в составе S2. $n=3$ биологических повторов. Столбики ошибок обозначают стандартное отклонение. ANOVA используют, чтобы определить, значительно ли различаются средние значения группы лечения. **: $p < 0,01$ в честном критерии значимости Тьюки между кандидатной LNP и S2.

На ФИГ. 10А-10С изображены типовые экспериментальные данные, демонстрирующие скрининг LNP, составленных с наиболее эффективными заместителями гидроксистерина, в первичных Т-клетках человека. На ФИГ. 10А изображена экспрессия люциферазы в первичных Т-клетках человека, обработанных составами LNP, содержащими гидроксистерина А1, А2 или В1 или S2, в дозе 300 нг иРНК/60000 клеток в течение 24 часов. $n=3$ биологических повтора. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение. Проводят ANOVA, чтобы определить, значительно ли различаются средние значения группы лечения. *: $p < 0,05$ в t-критерии Стьюдента между кандидатной LNP и S2. На ФИГ. 10В-10С изображена экспрессия люциферазы (ФИГ. 10В) и относительная жизнеспособность (ФИГ. 10С) первичных Т-клеток человека, обработанных S2, А1-25 и А1-50 в различных дозах. Экспрессию люциферазы нормализуют для клеток, обработанных стандартным составом LNP (S2), и фоновую люминесценцию вычитают. Процент жизнеспособности определяют путем нормализации к необработанным клеткам. Легенда обозначает процентное замещение каждого заместителя гидроксистерина в составе S2. Каждый пациент представлен отдельным маркером. $n=3$ биологических повтора. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ в t-критерии Стьюдента между S2 и А1-25 или А1-50.

На ФИГ. 11 изображены типовые экспериментальные данные, демонстрирующие эндосомальное поглощение и колокализацию LNP с эндосомами в Jurkat. Изображения конфокальной микроскопии клеток Jurkat, обработанных LNP, меченных DiO, в

концентрации 60 нг иРНК/60000 клеток и окрашенных Lysotracker. Изображения объединяют, фон вычитают, и корреляцию Спирмена используют для количественной оценки связи между LNP и кислыми органеллами в клетках. Статистику колокализации (*т.е.* корреляцию Спирмена) получают из 5 полей зрения (всего по меньшей мере 90 клеток) каждой группы лечения. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение. Проводят ANOVA, чтобы определить, значительно ли различаются групповые средние значения. *: $p < 0,05$ в t-критерии Стьюдента с коррекцией р-значения Бонферрони между статистикой колокализации из S2 и A1-25 или A1-50.

На ФИГ. 12А-12В изображены типовые экспериментальные данные, демонстрирующие характеристику эндосомальной направленной миграции LNP. Изображения Jurkat, полученные с помощью конфокальной микроскопии, окрашенные антителами к Rab5, Rab7 или Rab11. Клетки либо не подвергают обработке (UT), либо обрабатывают S2, A1-25 или A1-50 в концентрации 60 нг иРНК/60000 клеток (ФИГ. 12А) или 150 нг иРНК/60000 клеток (ФИГ. 12В). Экспрессию Rab5, Rab7 и Rab11 определяют количественно путем усреднения флуоресцентного сигнала по меньшей мере от 50 клеток в каждой группе лечения. Экспрессию белков Rab нормализуют к необработанным клеткам. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение. В каждой группе белков Rab используют ANOVA, чтобы определить, значительно ли различаются групповые средние значения. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ в t-критерии Стьюдента с коррекцией р-значения Бонферрони между S2 и A1-25 или A1-50.

На ФИГ. 13 представлена химическая структура типовых аналогов холестерина (*например*, желчных кислот), используемых в качестве компонентов в неограничивающих композициях, содержащих LNP, по настоящему изобретению.

На ФИГ. 14А-14Е представлены гистограммы, изображающие типовые экспериментальные данные, относящиеся к доставке и/или экспрессии иРНК (*например*, люциферазы) при введении типовых LNP по настоящему изобретению, содержащих хенодезоксихолевую кислоту (CDCA), холевую кислоту (CA), дезоксихолевую кислоту (DCA) и литохолевую кислоту (LCA) в клеточных линиях Caco-2 (ФИГ. 14А), HeLa (ФИГ. 14В), HepG2 (ФИГ. 14С), Jurkat (ФИГ. 14D) и Raji (ФИГ. 14Е); проценты указывают процент аналога холестерина, содержащего холестерин, компонент LNP (*например*, 25% для CDCA означает, что 25% общего холестеринного компонента LNP включает CDCA, и 75% составляет холестерин).

На ФИГ. 15А-15В показаны типовые данные, относящиеся к доставке и/или экспрессии иРНК (*например*, люциферазы) в печени, селезенке, матке, желудке, тонком и толстом кишечнике мышей при внутрибрюшинном (в/б) введении выбранных LNP по настоящему изобретению, содержащих аналоги холестерина, в виде гистограммы (ФИГ. 15А) и изображений (ФИГ. 15В).

На ФИГ. 16А-16В показаны типовые данные, относящиеся к доставке и/или экспрессии иРНК (*например*, люциферазы) в селезенке и печени при внутрибрюшинном (в/б) введении выбранных LNP по настоящему изобретению, содержащих аналоги

холестерина, в виде гистограммы (ФИГ. 16А) и изображений (ФИГ. 16В).

На ФИГ. 17А-17Е показаны гистограмма (ФИГ. 17А) и изображения (ФИГ. 17В-17Е), показывающие доставку и/или экспрессию иРНК (*например*, люциферазы) в сердце, легких, почках, матке, желудке, тонком кишечнике и толстом кишечнике мышей с внутривенным введением выбранных LNP по настоящему изобретению, содержащих аналоги холестерина, включая S2 (ФИГ. 17В), С100 (ФИГ. 17С), D50 (ФИГ. 17D) и E75 (ФИГ. 17Е).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Теперь будет сделана подробная ссылка на некоторые варианты осуществления раскрытого объекта изобретения, примеры которых частично проиллюстрированы на прилагаемых чертежах. Хотя раскрытый объект изобретения будет описан вместе с перечисленными пунктами формулы изобретения, следует понимать, что проиллюстрированный объект изобретения не предназначен для ограничения формулы изобретения раскрытым объектом изобретения.

В настоящем документе значения, выраженные в формате диапазона, должны интерпретироваться гибким образом, чтобы включать не только числовые значения, явно указанные как пределы диапазона, но также включать все отдельные числовые значения или поддиапазоны, включенные в этот диапазон, как если бы каждое числовое значение и поддиапазон были явно указаны. Например, диапазон «от примерно 0,1% до примерно 5%» или «от примерно 0,1% до примерно 5%» следует интерпретировать как включающий не только от примерно 0,1% до примерно 5%, но также и отдельные значения (*например*, 1%, 2%, 3% и 4%) и поддиапазоны (*например*, от 0,1% до 0,5%, от 1,1% до 2,2%, от 3,3% до 4,4%) в пределах указанного диапазона. Утверждение «примерно от X до Y» имеет то же значение, что и «от примерно X до примерно Y», если не указано иное. Аналогично, утверждение «примерно X, Y или примерно Z» имеет то же значение, что и «примерно X, примерно Y или примерно Z», если не указано иное.

В настоящем документе, термины «a», «an» или «the» используют для обозначения одного или более одного, если из контекста явно не следует иное. Термин «или» используется для обозначения неисключительного «или», если не указано иное. Утверждение «по меньшей мере один из A и B» или «по меньшей мере один из A или B» имеет то же значение, что и «A, B или A и B». Кроме того, следует понимать, что фразеология или терминология, используемые здесь и не определенные иным образом, предназначены только для целей описания, а не для ограничения. Любое использование заголовков разделов предназначено для облегчения чтения документа и не должно интерпретироваться как ограничение; информация, относящаяся к заголовку раздела, может встречаться внутри или за пределами этого конкретного раздела. Все публикации, патенты и патентные документы, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы они были включены посредством ссылки индивидуально.

В описанных в настоящем документе способах, действия могут выполняться в

любом порядке, за исключением случаев, когда временная или операционная последовательность явно выражена. Более того, указанные действия могут выполняться одновременно, если в формулировках явного утверждения не указано, что они выполняются отдельно. Например, заявленное действие по выполнению X и заявленное действие по выполнению Y могут выполняться одновременно в рамках одной операции, и результирующий процесс будет находиться в буквальном объеме заявленного процесса.

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит это изобретение. Хотя в практике или тестировании настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, описаны предпочтительные способы и материалы.

При использовании в настоящем документе, каждый из следующих терминов имеет значение, связанное с ним в настоящем разделе.

Артикли «a» и «an» используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта артикля. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Термин «примерно», используемый в настоящем документе в отношении измеряемой величины, такой как количество, временная продолжительность и т.п., подразумевает охват вариаций $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно, $\pm 5\%$, еще более предпочтительно, $\pm 1\%$, и еще более предпочтительно, $\pm 0,1\%$ от указанного значения, насколько такие изменения подходят для осуществления раскрытых способов.

Термин «адъювант», используемый в настоящем документе, определяется как любая молекула, усиливающая антиген-специфический адаптивный иммунный ответ.

Термин «алкенил», используемый в настоящем документе, относится к неразветвленным и разветвленным цепным и циклическим алкильным группам, как определено в настоящем документе, за исключением того, что между двумя атомами углерода существует по меньшей мере одна двойная связь. Таким образом, алкенильные группы имеют от 2 до 40 атомов углерода, или от 2 до примерно 20 атомов углерода, или от 2 до 12 атомов углерода, или, в некоторых вариантах осуществления, от 2 до 8 атомов углерода. Примеры включают, но не ограничены ими, винил, $-\text{CH}=\text{C}=\text{CCH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$, $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, циклогексенил, циклопентенил, циклогексадиенил, бутадиенил, пентадиенил и гексадиенил, среди прочих.

Термин «алкокси», используемый в настоящем документе, относится к атому кислорода, соединенному с алкильной группой, включая циклоалкильную группу, как определено в настоящем документе. Примеры линейных алкоксигрупп включают, но не ограничены ими, метокси, этокси, пропокси, бутокси, пентилокси, гексилокси и подобные. Примеры разветвленного алкокси включают, но не ограничены ими, изопропокси, втор-бутокси, трет-бутокси, изопентилокси, изогексилокси и подобные. Примеры циклического

алкокси включают, но не ограничены ими, циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси, циклогексилокси и подобные. Алкоксигруппа может включать от примерно 1 до примерно 12, от примерно 1 до примерно 20 или от примерно 1 до примерно 40 атомов углерода, связанных с атомом кислорода, и может дополнительно включать двойные или тройные связи, а также может включать гетероатомы. Например, аллилоксигруппа или метоксиэтоксигруппа также представляет собой алкоксигруппу в значении, данном в настоящем документе, как и метилendioксигруппа в контексте, когда ею замещены два соседних атома структуры.

Термин «алкил», используемый в настоящем документе, относится к алкильным группам с прямой и разветвленной цепью и циклоалкильным группам, имеющим от 1 до 40 атомов углерода, от 1 до примерно 20 атомов углерода, от 1 до 12 атомов углерода или, в некоторых вариантах осуществления, от 1 до 8 атомов углерода. Примеры алкильных групп с прямой цепью включают группы с числом атомов углерода от 1 до 8, такие как метильная, этиловая, н-пропильная, н-бутильная, н-пентильная, н-гексильная, н-гептильная и н-октильная группы. Примеры разветвленных алкильных групп включают, но не ограничены ими, изопропильную, изобутильную, втор-бутильную, трет-бутильную, неопентильную, изопентильную и 2,2-диметилпропильную группы. Используемый в настоящем документе термин «алкил» охватывает н-алкил, изоалкил и антеизоалкильные группы, а также другие формы алкила с разветвленной цепью. Типовые замещенные алкильные группы могут быть замещены один или несколько раз любой из групп, перечисленных в настоящем документе, например, амино, гидрокси, циано, карбокси, нитро, тио, алкокси и галогеновыми группами.

Термин «алкинил», используемый в настоящем документе, относится к алкильным группам с прямой и разветвленной цепью, за исключением того, что между двумя атомами углерода существует по меньшей мере одна тройная связь. Таким образом, алкинильные группы имеют от 2 до 40 атомов углерода, от 2 до примерно 20 атомов углерода или от 2 до 12 атомов углерода или, в некоторых вариантах осуществления, от 2 до 8 атомов углерода. Примеры включают, но не ограничены ими, $-C\equiv CH$, $-C\equiv C(CH_3)-$, $-C\equiv C(CH_2CH_3)$, $CH_2C\equiv CH$, $CH_2C\equiv C(CH_3)$ и $-CH_2C\equiv C(CH_2CH_3)$, среди прочих.

Термин «амин», используемый в настоящем документе, относится к первичным, вторичным и третичным аминам, имеющим, *например*, формулу $N(\text{группа})_3$, где каждая группа может независимо представлять собой Н или не-Н, например, алкил, арил и подобные. Амины включают, но не ограничены ими, $R-NH_2$, например, алкиламины, ариламины, алкилариламины; R_2NH , где каждый R выбран независимо, например, диалкиламины, диариламины, аралкиламины, гетероциклиламины и подобные; и R_3N , где каждый R выбран независимо, например, триалкиламины, диалкилариламины, алкилдиариламины, триариламины и подобные. Термин «амин» также включает ионы аммония, используемые в настоящем документе.

Термин «аминогруппа», используемый в настоящем документе, относится к заместителю формы $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$, $-NR_3^+$, где каждый R выбран независимо, и

протонированным формам каждого, за исключением $-NR_3^+$, который не может быть протонирован. Соответственно, любое соединение, замещенное аминогруппой, можно рассматривать как амин. «Аминогруппа» в значении, данном в настоящем документе, может представлять собой первичную, вторичную, третичную или четвертичную аминогруппу. «Алкиламино» группа включает моноалкиламино, диалкиламино и триалкиламино группу.

Термин «анионный липид» относится к любому липиду, который имеет отрицательный заряд при физиологическом pH. Эти липиды включают фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидную кислоту, N-додеканоилфосфатидилэтаноламины, N-сукцинилфосфатидилэтаноламины, N-глутарилфосфатидилэтаноламины, лизилфосфатидилглицерины, пальмитоилолеолфосфатидилглицерин (POPG) и другие анионные модифицирующие группы, присоединенные к нейтральным липидам.

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела обычно представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Антитела по настоящему изобретению могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к антигенным определяющим переменным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничены ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, антитела scFv и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

«Тяжелая цепь антитела», используемая в настоящем документе, относится к более крупному из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их природных конформациях.

«Легкая цепь антитела», используемая в настоящем документе, относится к меньшему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их природных конформациях. κ и λ легкие цепи относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

Под термином «синтетическое антитело», используемым в настоящем документе, понимают антитело, которое получают с использованием технологии рекомбинантной ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом. Этот термин также

следует истолковывать как означающий антитело, которое было создано в результате синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и где молекула ДНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, причем ДНК или аминокислотная последовательность были получены с использованием технологии синтетической ДНК или аминокислотных последовательностей, которая доступна и хорошо известна в данной области техники. Этот термин также следует истолковывать как означающий антитело, которое было получено в результате синтеза молекулы РНК, кодирующей антитело. Молекула РНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, причем РНК была получена путем транскрипции ДНК (синтетической или клонированной) или другой технологии, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

Термин «антиген» или «Ag», используемый в настоящем документе, определен как молекула, которая провоцирует адаптивный иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо продуцирование антител, либо активацию специфических иммуногенно-компетентных клеток, либо и то, и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки и пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК или РНК. Специалист в данной области техники поймет, что любая ДНК или РНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, вызывающий адаптивный иммунный ответ, тем самым кодирует «антиген», как этот термин используется в настоящем документе. Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничено этим, использование частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях, чтобы вызвать желаемый иммунный ответ. Более того, специалист в данной области техники поймет, что антиген вообще не обязательно должен кодироваться «геном». Совершенно очевидно, что антиген может быть синтезирован или получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничен ими, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Термин «арил», используемый в настоящем документе, относится к циклическим ароматическим углеводородным группам, которые не содержат гетероатомы в кольце. Таким образом, арильные группы включают, но не ограничены ими, фенильную, азуленильную, гепталенильную, бифенильную, индаценильную, флуоренильную, фенантренильную, трифениленильную, пиренильную, нафтаценильную, хризенильную, бифениленильную, антраценильную и нафтильную группы. В некоторых вариантах осуществления, арильные группы содержат от примерно 6 до примерно 14 атомов углерода в кольцевых частях групп. Арильные группы могут быть незамещенными или

замещенными, как определено в настоящем документе. Типовые замещенные арильные группы могут быть монозамещенными или замещены более одного раза, например, но не ограничены ими, фенильная группа, замещенная в любом одном или нескольких из 2-, 3-, 4-, 5- или 6-положениях фенильного кольца, или нафтильная группа, замещенная в любом одном или нескольких из 2- до 8- его положений.

Термин «катионный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд при выбранном рН, таком как физиологический рН (*например*, рН примерно 7,0). Было обнаружено, что катионные липиды, содержащие алкильные цепи с множеством сайтов ненасыщенности, например, по меньшей мере, с двумя или тремя сайтами ненасыщенности, особенно полезны для образования липидных частиц с повышенной текучестью мембран. Ряд катионных липидов и родственных аналогов, которые также могут быть использованы в настоящем изобретении, описаны в патентных публикациях США №№ 20060083780 и 20060240554; патентах США №№ 5,208,036; 5,264,618; 5,279,833; 5,283,185; 5,753,613; и 5,785,992; и публикации PCT № WO 96/10390, раскрытия которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. Неограничивающие примеры катионных липидов подробно описаны в настоящем документе. В некоторых случаях, катионные липиды содержат протонируемую головную группу третичного амина (*например*, титруемую по рН), C₁₈ алкильные цепи, эфирные связи между головной группой и алкильными цепями и от 0 до 3 двойных связей. Такие липиды включают, *например*, DSDMA, DLinDMA, DLenDMA и DODMA.

Термин «циклоалкил», используемый в настоящем документе, относится к циклическим алкильным группам, таким как, но не ограниченным ими, циклопропильная, циклобутильная, циклопентильная, циклогексильная, циклогептильная и циклооктильная группы. В некоторых вариантах осуществления, циклоалкильная группа может иметь от 3 до примерно 8-12 членов кольца, тогда как в других вариантах осуществления, число атомов углерода в кольце находится в диапазоне от 3 до 4, 5, 6 или 7. Циклоалкильные группы дополнительно включают полициклические циклоалкильные группы, такие как, но не ограниченные ими, норборнильная, адамантильная, борнильная, камфенильная, изокамфенильная и каренильная группы, и конденсированные кольца, такие как, но не ограниченные ими, декалинил и подобные. Циклоалкильные группы также включают кольца, которые замещены алкильными группами с прямой или разветвленной цепью, как определено в настоящем документе. Типовые замещенные циклоалкильные группы могут быть монозамещенными или замещены более одного раза, например, но не ограничиваясь ими, 2,2-, 2,3-, 2,4-2,5- или 2,6-дизамещенные циклогексильные группы или моно-, ди- или тризамещенные норборнильные или циклогептильные группы, которые могут быть замещены, например, амино, гидрокси, циано, карбоксильными, нитро, тио, алкокси и галогеновыми группами. Термин «циклоалкенил» отдельно или в комбинации обозначает циклическую алкенильную группу.

«Заболевание» представляет собой состояние здоровья животного, при котором

животное не может поддерживать гомеостаз и при котором, если заболевание не уменьшается, здоровье животного продолжает ухудшаться. Напротив, «нарушение» у животного представляет собой состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного менее благоприятно, чем оно было бы при отсутствии нарушения. При отсутствии лечения, нарушение не обязательно приводит к дальнейшему ухудшению состояния здоровья животного.

Используемые в настоящем документе термины «эффективное количество», «фармацевтически эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» относятся к нетоксичному, но достаточному количеству агента для обеспечения желаемого биологического результата. Результатом может быть уменьшение и/или облегчение признаков, симптомов или причин заболевания или любое другое желаемое изменение биологической системы. Подходящее терапевтическое количество в любом индивидуальном случае может быть определено специалистом в данной области техники с использованием рутинных экспериментов.

В частности, в случае иРНК, и «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» терапевтической нуклеиновой кислоты по отношению к иРНК представляет собой количество, достаточное для получения желаемого эффекта, *например*, иРНК-направленной экспрессии количества белка, которое вызывает желаемый биологический эффект в организме, в котором экспрессируется этот белок. Например, в некоторых вариантах осуществления, экспрессированный белок представляет собой активную форму белка, которая обычно экспрессируется в типе клеток в организме, и терапевтически эффективное количество иРНК представляет собой количество, которое производит количество кодируемого белка, которое составляет по меньшей мере 50% (*например*, по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%) количества белка, которое обычно экспрессируется в типе клеток здорового человека. Например, в некоторых вариантах осуществления, экспрессированный белок представляет собой белок, который обычно экспрессируется в клетках определенного типа в организме, и терапевтически эффективное количество иРНК представляет собой количество, которое продуцирует уровень экспрессии, аналогичный наблюдаемому у здорового индивидуума, у индивидуума с aberrантной экспрессией белка (*т.е.* индивидуума с дефицитом белка). Подходящие анализы для измерения экспрессии иРНК или белка включают, но не ограничены ими, дот-блоттинг, нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ*, ELISA, иммунопреципитацию, ферментную функцию, а также фенотипические анализы, известные специалистам в данной области техники.

Термин «кодировать», используемый в настоящем документе, относится к продукту, указанному (*например*, белку и РНК) данной последовательностью нуклеотидов в нуклеиновой кислоте (*т.е.* ДНК и/или РНК) при транскрипции или трансляции ДНК или РНК, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, термин «кодировать» относится к последовательности РНК, определенной посредством транскрипции

последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления, термин «кодировать» относится к аминокислотной последовательности (*например*, полипептиду или белку), определенной посредством трансляции иРНК. В некоторых вариантах осуществления, термин «кодировать» относится к аминокислотной последовательности, определяемой транскрипцией ДНК в иРНК и последующей трансляцией иРНК, кодируемой этой последовательностью ДНК. В некоторых вариантах осуществления, кодируемый продукт может содержать продукт прямой транскрипции или трансляции. В некоторых вариантах осуществления, кодированный продукт может содержать пост-трансляционные модификации, понятные или обоснованно ожидаемые специалистом в данной области техники.

«Вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть предоставлены клеткой-хозяином или системой экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все те, которые известны в данной области техники, такие как космиды, плазмиды (*например*, голые или содержащиеся в липосомах), РНК и вирусы (*например*, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

Термин «полностью инкапсулированный» указывает на то, что активный агент или терапевтический агент в липидной частице не подвергается значительному разложению после воздействия сыворотки или нуклеазного или протеазного анализа, который мог бы значительно разложить свободную ДНК, РНК или белок. В полностью инкапсулированной системе, предпочтительно, менее примерно 25% активного агента или терапевтического агента в частице разлагается при обработке, которая обычно разлагает 100% свободного активного агента или терапевтического агента, более предпочтительно, менее примерно 10%, и наиболее предпочтительно, менее примерно 5% активного агента или терапевтического агента в частице разлагается. В контексте терапевтических агентов на основе нуклеиновых кислот, полная инкапсуляция может быть определена с помощью анализа OLIGREEN®. OLIGREEN® представляет собой сверхчувствительный флуоресцентный краситель для нуклеиновых кислот для количественного определения олигонуклеотидов и одноцепочечной ДНК или РНК в растворе (доступен от Invitrogen Corporation; Carlsbad, Calif.). «Полностью инкапсулированные» также указывает на то, что липидные частицы стабильны в сыворотке, то есть что они не разлагаются быстро на составные части при введении *in vivo*.

Термины «галло», «галогеновая» или «галогенидная» группа, используемые в настоящем документе, сами по себе или как часть другого заместителя, означают, если не указано иное, атом фтора, хлора, брома или йода.

Термин «галогеналкильная» группа, используемый в настоящем документе,

включает моногалогеналкильные группы, полигалогеналкильные группы, в которых все атомы галогена могут быть одинаковыми или разными, и пергалогеналкильные группы, в которых все атомы водорода заменены атомами галогена, например, фтором. Примеры галогеналкила включают трифторметил, 1,1-дихлорэтил, 1,2-дихлорэтил, 1,3-дибром-3,3-дифторпропил, перфторбутил и подобные.

Термин «хелперный липид», используемый в настоящем документе, относится к липиду, способному повышать эффективность доставки частиц на основе липидов, таких как частицы на основе катионных липидов, к мишени, предпочтительно, в клетку. Хелперный липид может быть нейтральным, положительно заряженным или отрицательно заряженным. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид является нейтральным или отрицательно заряженным. Неограничивающие примеры хелперных липидов включают 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-ди-(9Z-октадецеаноил)-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC).е в состоянии здоровья животных.

Термин «гетероарил», используемый в настоящем документе, относится к ароматическим кольцевым соединениям, содержащим 5 или более членов кольца, из которых один или несколько представляют собой гетероатомы, такие как, но не ограниченные ими, N, O и S; например, гетероарильные кольца могут иметь от 5 до примерно 8-12 членов кольца. Гетероарильная группа представляет собой разновидность гетероциклической группы, обладающую ароматической электронной структурой. Гетероарильная группа, обозначенная как C₂-гетероарил, может представлять собой 5-кольцо с двумя атомами углерода и тремя гетероатомами, 6-кольцо с двумя атомами углерода и четырьмя гетероатомами и так далее. Подобным же образом C₄-гетероарил может представлять собой 5-кольцо с одним гетероатомом, 6-кольцо с двумя гетероатомами и так далее. Сумма атомов углерода плюс количество гетероатомов равно общему количеству атомов кольца. Гетероарильные группы включают, но не ограничены ими, такие группы, как пирролил, пиразолил, триазолил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, пиридинил, тиофенил, бензотиофенил, бензофуранил, индолил, азаиндолил, индазолил, бензимидазолил, азабензимидазолил, бензотиазолил, бензотиадиазолил, имидазопиридинил, изоксазолпиридинил, тианафталинил, пуринил, ксантинил, аденинил, гуанинил, хинолинил, изохинолинил, тетрагидрохинолинил, хиноксалинил и хиназолинил. Гетероарильные группы могут быть незамещенными или могут быть замещены группами, как обсуждается в настоящем документе. Типовые замещенные гетероарильные группы могут быть замещены один или несколько раз группами, такими как перечислены в настоящем документе.

Дополнительные примеры арильных и гетероарильных групп включают, но не ограничены ими, фенил, бифенил, инденил, нафтил (1-нафтил, 2-нафтил), N-гидрокситетразолил, N-гидрокситриазолил, N-гидроксиимидазолил, антраценил (1-антраценил, 2-антраценил, 3-антраценил), тиофенил (2-тиенил, 3-тиенил), фурил (2-фурил,

3-фурил), индолил, оксадиазолил, изоксазолил, хиназолинил, флуоренил, ксантенил, изоинданил, бензгидрил, акридини́л, тиазолил, пирролил (2-пирролил), пиразолил (3-пиразолил), имидазолил (1-имидазолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, 5-имидазолил), триазолил (1,2,3-триазол-1-ил, 1,2,3-триазол-2-ил, 1,2,3-триазол-4-ил, 1,2,4-триазол-3-ил), оксазолил (2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил), тиазолил (2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил), пиридил (2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил), пиримидинил (2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, 6-пиримидинил), пиразинил, пиридазинил (3-пиридазинил, 4-пиридазинил, 5-пиридазинил), хинолил (2-хинолил, 3-хинолил, 4-хинолил, 5-хинолил, 6-хинолил, 7-хинолил, 8-хинолил), изохинолил (1-изохинолил, 3-изохинолил, 4-изохинолил, 5-изохинолил, 6-изохинолил, 7-изохинолил, 8-изохинолил), бензо[b]фуранил (2-бензо[b]фуранил, 3-бензо[b]фуранил, 4-бензо[b]фуранил, 5-бензо[b]фуранил, 6-бензо[b]фуранил, 7-бензо[b]фуранил), 2,3-дигидробензо[b]фуранил (2-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 3-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 4-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 5(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 6-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 7-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), бензо[b]тиофенил (2-бензо[b]тиофенил, 3-бензо[b]тиофенил, 4-бензо[b]тиофенил, 5-бензо[b]тиофенил, 6-бензо[b]тиофенил, 7-бензо[b]тиофенил), 2,3-дигидробензо[b]тиофенил, (2-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил)), 3-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 4-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 5-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 6-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 7-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), индолил (1-индолил, 2-индолил, 3-индолил, 4-индолил, 5-индолил, 6-индолил, 7-индолил), индазол (1-индазолил, 3-индазолил, 4-индазолил, 5-индазолил, 6-индазолил, 7-индазолил), бензимидазолил (1-бензимидазолил, 2-бензимидазолил, 4-бензимидазолил, 5-бензимидазолил, 7-бензимидазолил, 8-бензимидазолил), бензоксазолил (1-бензоксазолил, 2-бензоксазолил), бензотиазолил (1-бензотиазолил, 2-бензотиазолил, 4-бензотиазолил, 5-бензотиазолил, 6-бензотиазолил, 7-бензотиазолил), карбазолил (1-карбазолил, 2-карбазолил, 3-карбазолил, 4-карбазолил), 5Н-дибенз[b,f]азепин (5Н-дибенз[b, f]азепин-1-ил, 5Н-дибенз[b,f]азепин-2-ил, 5Н-дибенз[b,f]азепин-3-ил, 5Н-дибенз[b,f]азепин-4-ил, 5Н-дибенз[b,f]азепин-5-ил), 10,11-дигидро-5Н-дибенз[b,f]азепин (10,11-дигидро-5Н-дибенз[b,f]азепин-1-ил, 10,11-дигидро-5Н-дибенз[b,f]азепин-2-ил, 10,11-дигидро-5Н-дибенз[b,f]азепин-3-ил, 10,11-дигидро-5Н-дибенз[b,f]азепин-4-ил, 10,11-дигидро-5Н-дибенз[b,f]азепин-5-ил) и подобные.

Термин «гетероциклоалкил», используемый в настоящем документе, относится к алифатической, частично ненасыщенной или полностью насыщенной, 3-14-членной кольцевой системе, включая одиночные кольца с 3-8 атомами и би- и трициклические кольцевые системы, в которых по меньшей мере один из атомов углерода атомы кольца заменены гетероатомом, таким как, но не ограниченным ими, азот, кислород, сера или фосфор. Гетероциклоалкил может включать от одного до четырех гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота и серы, где гетероатом азота и серы необязательно может быть окислен, и гетероатом азота необязательно может быть замещен.

Типовые гетероциклоалкильные группы включают, но не ограничены ими, следующие типовые группы: пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил и тетрагидрофурил.

Термин «гетероциклил», используемый в настоящем документе, относится к ароматическим и неароматическим кольцевым соединениям, содержащим три или более членов кольца, из которых один или несколько представляют собой гетероатом, такой как, но не ограниченный ими, N, O и S. Таким образом, гетероциклил может представлять собой циклогетероалкил или гетероарил, или, если он полициклический, то любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, гетероциклильные группы включают от 3 до примерно 20 членов кольца, тогда как другие такие группы имеют от 3 до примерно 15 членов кольца. Гетероциклильная группа, обозначенная как C₂-гетероциклил, может представлять собой 5-кольцо с двумя атомами углерода и тремя гетероатомами, 6-кольцо с двумя атомами углерода и четырьмя гетероатомами и так далее. Подобным же образом C₄-гетероциклил может представлять собой 5-кольцо с одним гетероатомом, 6-кольцо с двумя гетероатомами и так далее. Количество атомов углерода плюс количество гетероатомов равняется общему числу атомов кольца. Гетероциклильное кольцо также может включать одну или несколько двойных связей. Гетероарильное кольцо представляет собой вариант гетероциклильной группы. Фраза «гетероциклильная группа» включает виды конденсированных колец, включая те, которые включают конденсированные ароматические и неароматические группы. Например, как диоксоланильное кольцо, так и бенздиоксоланильная кольцевая система (кольцевая система метилendioксифенила) представляют собой гетероциклильные группы в значении настоящего документа. Фраза также включает полициклические кольцевые системы, содержащие гетероатом, такой как, но не ограниченный ими, хинуклидил. Гетероциклильные группы могут быть незамещенными или могут быть замещены, как обсуждается в настоящем документе. Гетероциклильные группы включают, но не ограничены ими, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, пирролил, пиразолил, триазолил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, пиридинил, тиофенил, бензотиофенил, бензофуранил, дигидробензофуранил, индолил, дигидроиндолил, азаиндолил, индазолил, бензимидазолил, азабензимидазолил, бензоксазолил, бензотиазолил, бензотиадиазолил, имидазопиридинил, изоксазолпиридинил, тианафталенил, пуринил, ксантинил, аденинил, гуанинил, хинолинил, изохинолинил, тетрагидрохинолинил, хиноксалинил и хиназолинил. Типовые замещенные гетероциклильные группы могут быть монозамещенными или замещены более одного раза, например, но не ограничиваясь ими, пиперидинильные или хинолинильные группы, которые являются 2-, 3-, 4-, 5- или 6-замещенными или дизамещенными группами, такими как перечислены в настоящем документе.

«Гомологичный», используемый в настоящем документе, относится к сходству или идентичности последовательностей между двумя полипептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Когда положение в обеих из двух сравниваемых

последовательностей занято одной и той же субъединицей мономера основания или аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы гомологичны в настоящем положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленного на количество сравниваемых положений $\times 100$. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совмещены или гомологичны, тогда две последовательности гомологичны на 60%. Например, последовательности ДНК АТТГСС и ТАТГГС имеют 50% гомологию. Обычно сравнение проводится, когда две последовательности выровнены для обеспечения максимальной гомологии.

Термин «ионизируемый липид», используемый в настоящем документе, относится к липиду (*например*, катионному липиду), имеющему по меньшей мере одну протонируемую или депротонируемую группу, так что липид положительно заряжен при рН, равном или ниже физиологического рН (*например*, рН 7,4) и нейтральным при втором рН, предпочтительно, при физиологическом рН или выше. Специалисту в данной области техники будет понятно, что добавление или удаление протонов в зависимости от рН является равновесным процессом, и что ссылка на заряженный или нейтральный липид относится к природе преобладающих видов и не имеет требования, чтобы весь липид присутствовал в заряженной или нейтральной форме. Обычно ионизируемые липиды имеют pK_a протонируемой группы в диапазоне от примерно 4 до примерно 7.

«Иммуноген» относится к любому веществу, введенному в организм с целью вызвать иммунный ответ. Это вещество может представлять собой физическую молекулу, например белок, или может кодироваться вектором, например ДНК, иРНК или вирусом.

«Иммунная клетка», как этот термин используется в настоящем документе, означает любую клетку, участвующую в возникновении иммунного ответа. Такие клетки включают, но не ограничены ими, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки и макрофаги), моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и подобные.

«Выделенный» означает измененный или удаленный из состояния в природе. Например, нуклеиновая кислота или пептид, присутствующие в природе в живом животном, не являются «выделенными», но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в своем состоянии в природе, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

Термин «липид» относится к группе органических соединений, которые включают, но не ограничены ими, эфиры жирных кислот, и характеризуются тем, что они нерастворимы в воде, но растворимы во многих органических растворителях. Их обычно делят по меньшей мере на три класса: (1) «простые липиды», которые включают жиры и масла, а также воски; (2) «сложные липиды», которые включают фосфолипиды и

гликолипиды; и (3) «производные липиды», такие как стероиды.

Термин «конъюгированный липид», используемый в настоящем документе, относится к липиду, который конъюгирован с одной или несколькими полимерными группами, которые ингибируют агрегацию липидных частиц. Такие липидные конъюгаты включают, но не ограничены ими, полиамидные олигомеры (*например*, АТТА-липидные конъюгаты), PEG-липидные конъюгаты, такие как PEG, связанный с диалкилоксипропилами, PEG, связанный с диацилглицеринами, PEG, связанный с холестерином, PEG, связанный с фосфатидилэтаноламинами, PEG, конъюгированные с церамидами (*например*, патент США № 5,885,613, описание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей), катионные PEG-липиды и их смеси. PEG может быть конъюгирован непосредственно с липидом или может быть связан с липидом через линкерный фрагмент. Можно использовать любой линкерный фрагмент, подходящий для связывания PEG с липидом, включая, *например*, линкерные фрагменты, не содержащие сложный эфир и линкерные фрагменты, содержащие сложный эфир. В предпочтительных вариантах осуществления используют линкерные фрагменты, не содержащие сложный эфир.

Используемый в настоящем документе термин «инкапсулированный в липид» может относиться к липидной частице, которая содержит активный агент или терапевтический агент, такой как нуклеиновая кислота (*например*, белковый груз), с полной инкапсуляцией, частичной инкапсуляцией или тем и другим. В предпочтительном варианте осуществления, нуклеиновая кислота полностью инкапсулирована в липидную частицу (*например*, с образованием SPLP, pSPLP, SNALP или другой частицы нуклеиновая кислота-липид).

Термин «липидная наночастица» относится к частице, имеющей по меньшей мере один размер порядка нанометров (*например*, 1-1000 нм), которая включает один или несколько липидов и/или дополнительных агентов.

Термин «липидная частица» используется в настоящем документе для обозначения липидной композиции, которую можно использовать для доставки активного агента или терапевтического агента, такого как нуклеиновая кислота (*например*, иРНК), к представляющему интерес сайту-мишени. В липидной частице по настоящему изобретению, которая обычно образуется из катионного липида, некаатионного липида и конъюгированного липида, который предотвращает агрегацию частицы, активный агент или терапевтический агент может быть инкапсулирован в липид, тем самым защищая агент от ферментативной деградации.

В контексте настоящего изобретения, используются следующие сокращения для часто встречающихся нуклеозидов (нуклеиновых оснований, связанных с сахаром рибозы или дезоксирибозы посредством N-гликозидной связи). «А» относится к аденозину, «С» относится к цитидину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину и «U» относится к уридину.

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность», кодирующая

аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК», может также включать интроны до такой степени, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторой версии содержать интрон(ы).

Термин «модулирующий», используемый в настоящем документе, означает опосредование обнаруживаемого повышения или снижения уровня ответа у субъекта по сравнению с уровнем ответа у субъекта в отсутствие лечения или соединения, и/или по сравнению с уровнем ответа у идентичного, но не получавшего лечения субъекта. Этот термин охватывает возмущение и/или воздействие на нативный сигнал или ответ, тем самым опосредуя полезный терапевтический ответ у субъекта, предпочтительно, человека.

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки и РНК, могут включать интроны. Кроме того, нуклеотидная последовательность может содержать модифицированные нуклеозиды, которые способны транслироваться с помощью механизма трансляции в клетке. Например, иРНК, в которой все уридины заменены псевдоуридином, 1-метилпсевдоуридином или другим модифицированным нуклеозидом.

Термин «нейтральный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые существуют либо в незаряженной, либо в нейтральной цвиттерионной форме при выбранном рН. При физиологическом рН, такие липиды включают, например, диацилфосфатидилхолин, диацилфосфатидилэтанолламин, церамид, сфингомиелин, цефалин, холестерин, цереброзиды и диацилглицерины.

Термин «некатионный липид» относится к любому амфипатическому липиду, а также к любому другому нейтральному липиду или анионному липиду.

Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, приводящей к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональном отношении со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Обычно функционально связанные последовательности ДНК или РНК являются смежными и, когда необходимо соединить две области, кодирующие белок, находятся в одной и той же рамке считывания.

Термины «пациент», «субъект», «индивидуум» и подобные используются в

настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому животному или его клеткам, как *in vitro*, так и *in situ*, поддающимся способам, описанным в настоящем документе. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления, пациент, субъект или индивидуум представляет собой человека.

Термин «липид, конъюгированный сполимером» относится к молекуле, содержащей как липидную часть, так и полимерную часть. Примером липида, конъюгированного с полимером, является пегилированный липид. Термин «пэгилированный липид» относится к молекуле, содержащей как липидную часть, так и полиэтиленгликолевую часть. Пегилированные липиды известны в данной области техники и включают 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)2,3димиристоилглицерин (PEG-s-DMG), DSPE-PEG-DBCO, DOPE-PEG-азид, DSPE-PEG-азид, DPPE-PEG-азид, DSPE-PEG-карбоксих-NHS, DOPE-PEG-карбоновую кислоту, DSPE-PEG-карбоновую кислоту и подобные.

Термин «полинуклеотид», используемый в настоящем документе, определен как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов. Таким образом, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды, используемые в настоящем документе, являются взаимозаменяемыми. Специалисту в данной области техники известно, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые можно гидролизовать до мономерных «нуклеотидов». Мономерные нуклеотиды могут гидролизоваться до нуклеозидов. В настоящем документе, полинуклеотиды включают, но не ограничены ими, все последовательности нуклеиновой кислоты, которые получены любыми способами, доступными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновых кислот из рекомбинантной библиотеки или клетки генома, используя обычную технологию клонирования и PCR™ и подобные, а также синтетические способы.

В некоторых случаях, полинуклеотид или нуклеиновая кислота по изобретению представляет собой «нуклеозид-модифицированную нуклеиновую кислоту», которая относится к нуклеиновой кислоте, содержащей по меньшей мере один модифицированный нуклеозид. «Модифицированный нуклеозид» относится к нуклеозиду с модификацией. Например, в РНК было идентифицировано более ста различных модификаций нуклеозидов (Rozenski, et al., 1999, The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res 27: 196-197).

В некоторых вариантах осуществления, термин «псевдоуридин» относится к $m^1asc^3\psi$ (1-метил-3-(3-амино-3-карбоксивпропил)псевдоуридину). В некоторых вариантах осуществления, термин относится к $m^1\psi$ (1-метилпсевдоуридину). В некоторых вариантах осуществления, термин относится к ψm (2'-О-метилпсевдоуридину). В некоторых вариантах осуществления, термин относится к m^5D (5-метилдигидроуридину). В некоторых вариантах осуществления, термин относится к $m^3\psi$ (3-метилпсевдоуридину). В некоторых вариантах осуществления, термин относится к псевдоуридиновому фрагменту, который дополнительно не модифицируется. В некоторых вариантах осуществления, термин относится к монофосфату, дифосфату или трифосфату любого из вышеуказанных

псевдоуридинов. В некоторых вариантах осуществления, этот термин относится к любому другому псевдоуридину, известному в данной области техники. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Используемый в настоящем документе, термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и никаких ограничений на максимальное количество аминокислот, которые могут содержать последовательность белка или пептида, не налагается. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или несколько аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как используется в настоящем документе, этот термин относится как к коротким цепям, которые также обычно называются в данной области техники, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, так и к более длинным цепям, которые обычно называются в данной области белками, из которых есть много типов. «Полипептиды» включают, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки, среди прочих. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинации.

Термин «промотор», используемый в настоящем документе, определен как последовательность ДНК, распознаваемая синтетическим механизмом клетки или введенным синтетическим механизмом, необходимым для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности. Например, промотор, который распознается РНК-полимеразой бактериофага и используется для генерации иРНК путем транскрипции *in vitro*.

Термин «специфически связывается», используемый в настоящем документе в отношении антитела, означает антитело, которое распознает специфический антиген, но по существу не распознает и не связывает другие молекулы в образце. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном одного вида, может также связываться с этим антигеном одного или нескольких других видов. Однако такая межвидовая реактивность сама по себе не меняет классификацию антитела как специфического. В другом примере, антитело, которое специфически связывается с антигеном, может также связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не меняет классификацию антитела как специфического. В некоторых случаях, термины «специфическое связывание» или «специфически связывается» могут использоваться в отношении взаимодействия антитела, белка или пептида со вторым химическим видом, что означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) химического вида; например, антитело распознает и связывается с определенной белковой структурой, а не с белками в целом. Если антитело специфично к эпитопу «А», присутствие

молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакции, содержащей меченый «А» и антитело, уменьшит количество меченого А, связанного с антителом.

Термин «замещенный», используемый в настоящем документе в сочетании с молекулой или органической группой, как определено в настоящем документе, относится к состоянию, в котором один или несколько содержащихся в ней атомов водорода заменены одним или несколькими не водородными атомами. Термин «функциональная группа» или «заместитель», используемый в настоящем документе, относится к группе, которая может быть замещена или замещена в молекуле или в органической группе. Примеры заместителей или функциональных групп включают, но не ограничены ими, галоген (*например*, F, Cl, Br и I); атом кислорода в таких группах, как гидроксигруппы, алкоксигруппы, арилоксигруппы, аралкилоксигруппы, оксо(карбонильные) группы, карбоксильные группы, включая карбоновые кислоты, карбоксилаты и сложные эфиры карбоксилатов; атом серы в таких группах, как тиоловые группы, алкил- и арилсульфидные группы, сульфоксидные группы, сульфоновые группы, сульфонильные группы и сульфонамидные группы; атом азота в таких группах, как амины, гидроксиамины, нитрилы, нитрогруппы, N-оксиды, гидразиды, азиды и енамины; и другие гетероатомы в различных других группах. Неограничивающие примеры заместителей, которые могут быть связаны с замещенным атомом углерода (или другим) атомом, включают F, Cl, Br, I, OR, OC(O)N(R)₂, CN, NO, NO₂, ONO₂, азидо, CF₃, OCF₃, R, O (оксо), S (тионо), C(O), S(O), метилendiокси, этилендиокси, N(R)₂, SR, SOR, SO₂R, SO₂N(R)₂, SO₃R, C(O)R, C(O)C(O)R, C(O)CH₂C(O)R, C(S)R, C(O)OR, OC(O)R, C(O)N(R)₂, OC(O)N(R)₂, C(S)N(R)₂, (CH₂)₀₋₂N(R)C(O)R, (CH₂)₀₋₂N(R)N(R)₂, N(R)N(R)C(O)R, N(R)N(R)C(O)OR, N(R)N(R)CON(R)₂, N(R)SO₂R, N(R)SO₂N(R)₂, N(R)C(O)OR, N(R)C(O)R, H(R)C(S)R, N(R)C(O)N(R)₂, N(R)C(S)N(R)₂, N(COR)COR, N(OR)R, C(=NH)N(R)₂, C(O)N(OR)R и C(=NOR)R, где R может представлять собой водород или фрагмент на основе углерода; например, R может представлять собой водород, (C₁-C₁₀₀) гидрокарбил, алкил, ацил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероциклил, гетероарил или гетероарилалкил; или где две группы R, связанные с атомом азота или соседними атомами азота, могут вместе с атомом или атомами азота образовывать гетероциклил.

Термин «терапевтический», используемый в настоящем документе, означает лечение и/или профилактику. Терапевтический эффект достигается путем подавления, уменьшения, ремиссии или устранения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству рассматриваемого соединения, которое вызовет биологический или медицинский ответ ткани, системы или субъекта, которого ищет исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Термин «терапевтически эффективное количество» включает такое количество соединения, которое при введении достаточно для предотвращения развития или облегчения в некоторой степени одного или нескольких признаков или симптомов нарушения или заболевания, подлежащего лечению. Терапевтически эффективное

количество будет варьироваться в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести, а также возраста, веса и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

«Лечить» заболевание, как этот термин используется в настоящем документе, означает снижать частоту или тяжесть по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом.

Термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трандуцированный», используемый в настоящем документе, относится к процессу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяина. «Трансфицированная» или «трансформированная» или «трандуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трандуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку-субъект и ее потомство.

Фразы «под транскрипционным контролем» или «функционально связанный», используемые в настоящем документе, означают, что промотор находится в правильном местоположении и ориентации по отношению к полинуклеотиду для контроля инициации транскрипции РНК-полимеразой и экспрессии полинуклеотида.

«Вектор» представляет собой композицию вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области техники известны многочисленные векторы, включая, но не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Этот термин также следует понимать как включающий не плазмидные и не вирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, соединения полилизина, липосомы и подобные. Примеры вирусных векторов включают, но не ограничены ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы и подобные.

Диапазоны: в настоящем описании, различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено просто для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения внутри этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как имеющее конкретно раскрытые поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в настоящем диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо независимо от ширины диапазона.

Липидные наночастицы (LNP) и их композиции

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к липидной наночастице (LNP), которая в некоторых вариантах осуществления является частью композиции, такой как, но

не ограниченной ими, фармацевтическая композиция.

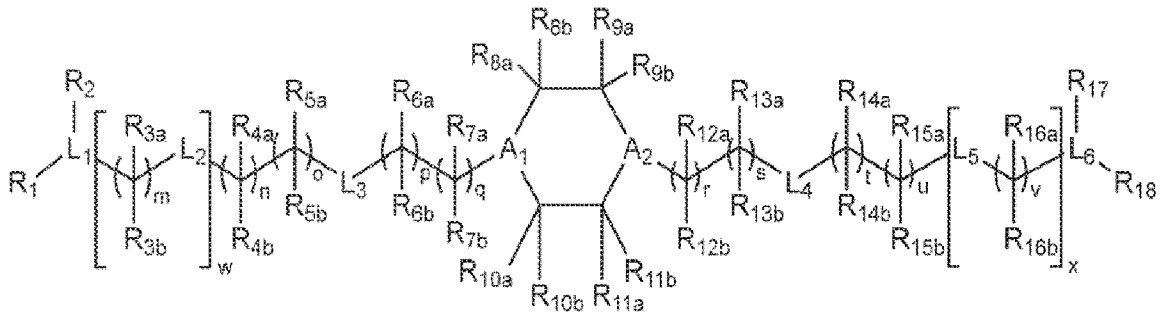
В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один ионизируемый липид, где ионизируемый липид составляет от примерно 10 до примерно 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один хелперный липид, где хелперный липид составляет от примерно 10% моль до примерно 45% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из холестерина и заменителя холестерина, где комбинация холестерина и заменителя холестерина составляет от примерно 5% моль до примерно 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один полиэтиленгликоль (PEG) или PEG-конъюгированный липид, где PEG или PEG-конъюгированный липид составляет от примерно 0,5% моль до примерно 12,5% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, LNP дополнительно содержит по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты и терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота и/или терапевтический агент по меньшей мере частично инкапсулированы в них.

В некоторых вариантах осуществления, LNP дополнительно содержит по меньшей мере один агент, выбранный из группы, состоящей из иРНК, миРНК, микроРНК, CRISPR-Cas9, малой молекулы, белка и антитела. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из кДНК, иРНК, микроРНК, миРНК, модифицированной РНК, антагомира, антисмысловой молекулы и таргетированной нуклеиновой кислоты или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты кодирует химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, CAR специфичен к связыванию с поверхностным антигеном патогенной клетки или опухолевой клетки. В некоторых вариантах осуществления, LNP дополнительно содержит таргетирующий домен, специфичный для связывания с представляющей интерес клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из моноклеарных клеток периферической крови и иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит домен, таргетирующий иммунные клетки, специфичный для связывания с Т-клеткой.

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен специфически связывается по меньшей мере с одной поверхностной молекулой, выбранной из группы, состоящей из CD1, CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD16, CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD38, CD39, CD40L, CD44, CD45, CD62L, CD69, CD73, CD80, CD83, CD86, CD95, CD103, CD119, CD126, CD150, CD153, CD154, CD161, CD183, CD223, CD254, CD275, CD45RA, CXCR3, CXCR5, FasL, IL18R1, CTLA-4, OX40, GITR, LAG3, ICOS, PD-1, leu-12, TCR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, NKG2D, CCR, CCR1, CCR2, CCR4, CCR6 и CCR7.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (I) или его соль или сольват:



Формула (I),

в которой:

A_1 и A_2 независимо выбраны из группы, состоящей из CH, N и P;

L_1 и L_6 каждый независимо выбран из группы, состоящей из CR_{19} и N;

каждый случай L_2 и L_5 независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CHR_{19}-$, $-O-$, $-NH-$ и $-NR_{19}-$;

L_3 и L_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CHR_{19}-$, $-O-$, $-NH-$ и $-NR_{19}-$;

каждый случай R_1 , R_2 , R_{3a} , R_{3b} , R_{4a} , R_{4b} , R_{5a} , R_{5b} , R_{6a} , R_{6b} , R_{7a} , R_{7b} , R_{8a} , R_{8b} , R_{9a} , R_{9b} , R_{10a} , R_{10b} , R_{11a} , R_{11b} , R_{12a} , R_{12b} , R_{13a} , R_{13b} , R_{14a} , R_{14b} , R_{15a} , R_{15b} , R_{16a} , R_{16b} , R_{17} , R_{18} и R_{19} независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, $-Y(R_{20})_z(R_{21})_z-$ (необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, $-Y(R_{20})_z(R_{21})_z-$ (необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила), необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, $-Y(R_{20})_z(R_{21})_z-$ (необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила), необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, $-Y(R_{20})_z(R_{21})_z-$ (необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила), необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, $-Y(R_{20})_z(R_{21})_z-$ (необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила), необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила, $-Y(R_{20})_z(R_{21})_z-$ (необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила), C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1 - C_{28} аминоалкила, C_2 - C_{28} аминоалкенила, C_2 - C_{28} аминоалкинила, C_6 - C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1 - C_{28} гидроксиалкила, C_2 - C_{28} гидроксиалкенила, C_2 - C_{28} гидроксиалкинила, C_6 - C_{10} гидроксиарила, C_1 - C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата, сложного эфира, $-Y(R_{20})_z(R_{21})_z-$ эфира, $-Y(R_{20})_z(R_{21})_z-$, $-NO_2$, $-CN$ и сульфокси,

или два геминальных заместителя, выбранных из R_{3a} и R_{3b} , R_{4a} и R_{4b} , R_{5a} и R_{5b} , R_{6a} и R_{6b} , R_{7a} и R_{7b} , R_{8a} и R_{8b} , R_{9a} и R_{9b} , R_{10a} и R_{10b} , R_{11a} и R_{11b} , R_{12a} и R_{12b} , R_{13a} и R_{13b} , R_{14a} и R_{14b} или R_{15a} и R_{15b} могут быть объединены с атомом C, с которым они связаны, с образованием $C=O$;

каждый случай Y независимо выбран из группы, состоящей из C, N, O, S и P;

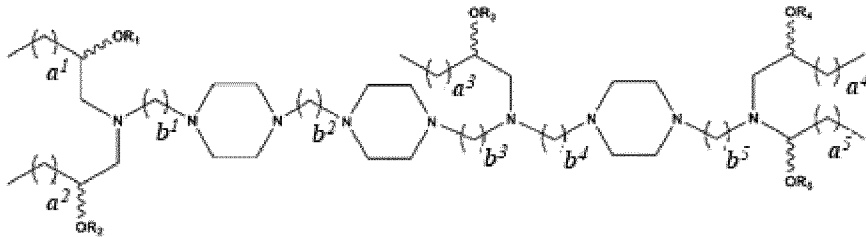
каждый случай R₂₀ и R₂₁ независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C₁-C₂₈ алкила, необязательно замещенного C₃-C₁₂ циклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероциклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероциклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₂₈ алкенила, необязательно замещенного C₅-C₁₂ циклоалкенила, необязательно замещенного C₂-C₂₈ алкинила, необязательно замещенного C₆-C₁₂ циклоалкинила, необязательно замещенного C₆-C₁₀ арила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероарила, C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, линейного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, разветвленного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, C(=O)NH₂, NH₂, C₁-C₂₈ аминоалкила, C₂-C₂₈ аминоалкенила, C₂-C₂₈ аминоалкинила, C₆-C₁₀ аминоарила, аминоксета, ацила, OH, C₁-C₂₈ гидроксиалкила, C₂-C₂₈ гидроксиалкенила, C₂-C₂₈ гидроксиалкинила, C₆-C₁₀ гидроксиарила, C₁-C₂₈ алкокси, карбоксила, карбоксилата, сложного эфира, -NO₂, -CN и сульфокси,

или R₂₀ и R₂₁ могут быть объединены с атомом Y, с которым они связаны, с образованием C=O);

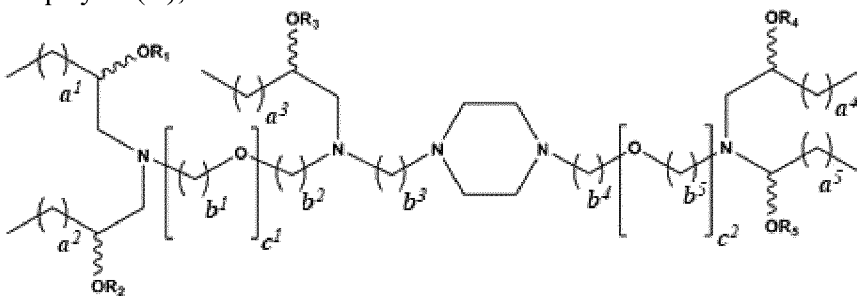
каждый случай z' и z'' независимо равен 0, 1 или 2; и

каждый случай m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w и x независимо равен 0, 1, 2; 3, 4 или 5.

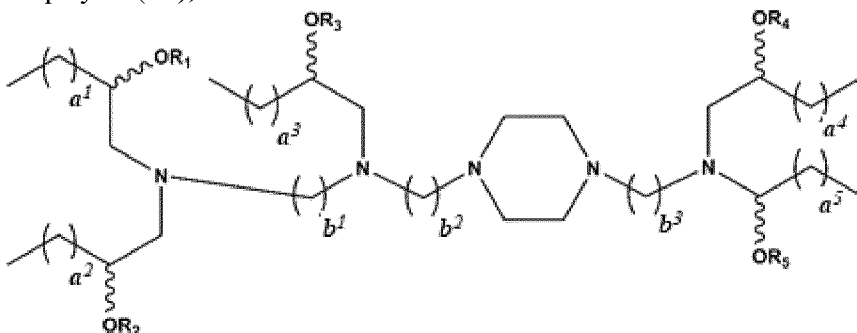
В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид Формулы (I) выбран из группы, состоящей из:



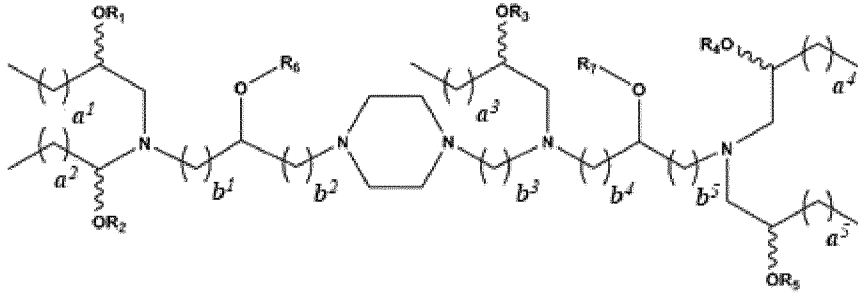
Формула (II),



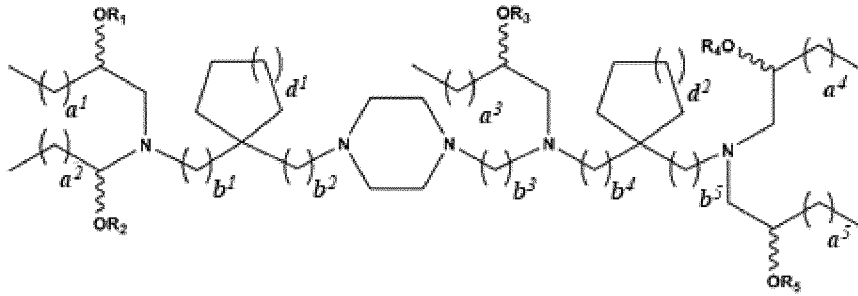
Формула (III),



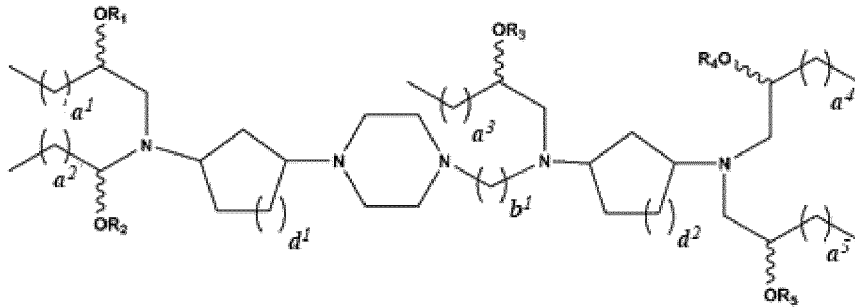
Формула (IV),



Формула (V),



Формула (VI) и



Формула (VII),

в которой:

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 и R_7 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила, C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1 - C_{28} аминоалкила, C_2 - C_{28} аминоалкенила, C_2 - C_{28} аминоалкинила, C_6 - C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1 - C_{28} гидроксиалкила, C_2 - C_{28} гидроксиалкенила, C_2 - C_{28} гидроксиалкинила, C_6 - C_{10} гидроксиарила, C_1 - C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата и сложного эфира;

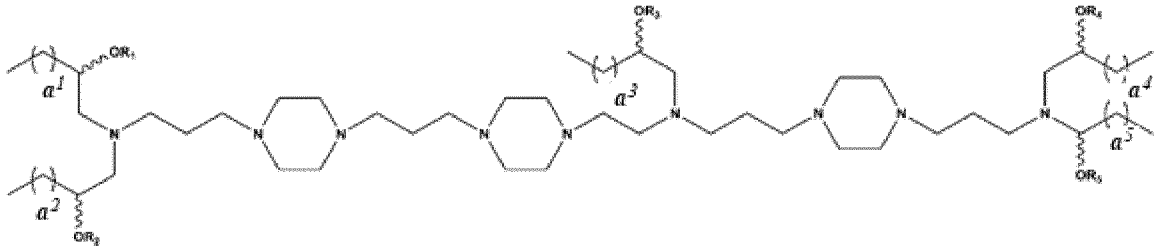
a^1 , a^2 , a^3 , a^4 и a^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

b^1 , b^2 , b^3 , b^4 и b^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

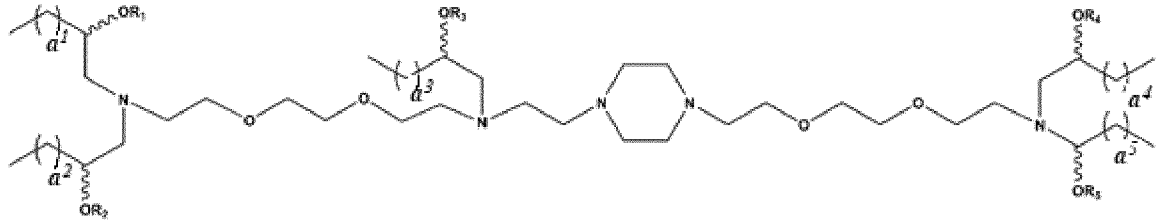
c^1 и c^2 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5; и

d^1 и d^2 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

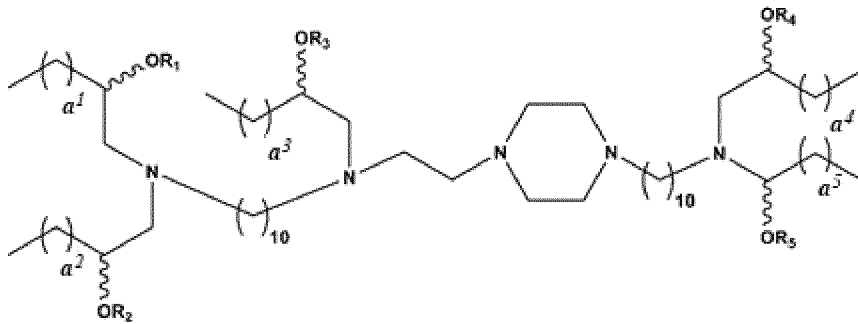
В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид Формулы (I) выбран из группы, состоящей из:



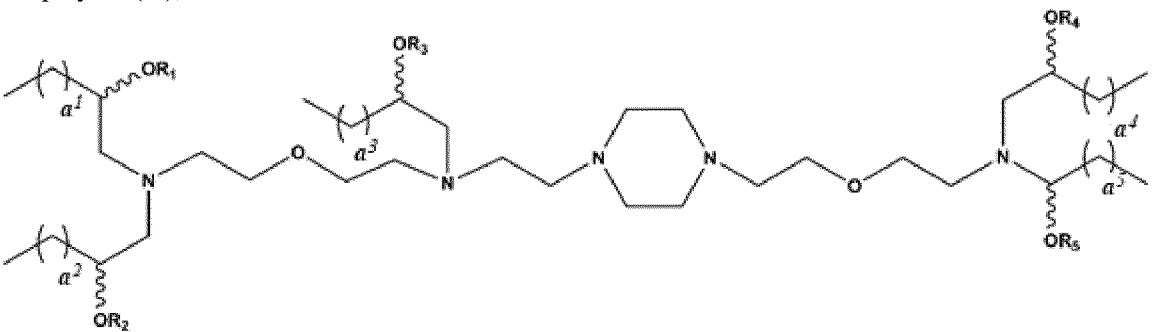
Формула (VIII),



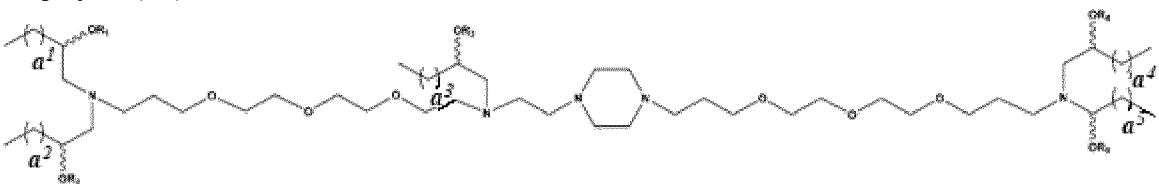
Формула (IX),



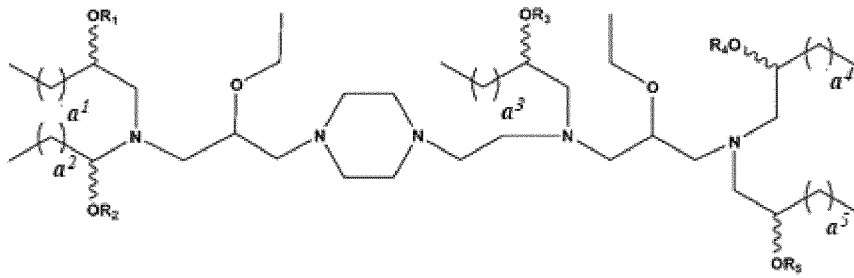
Формула (X),



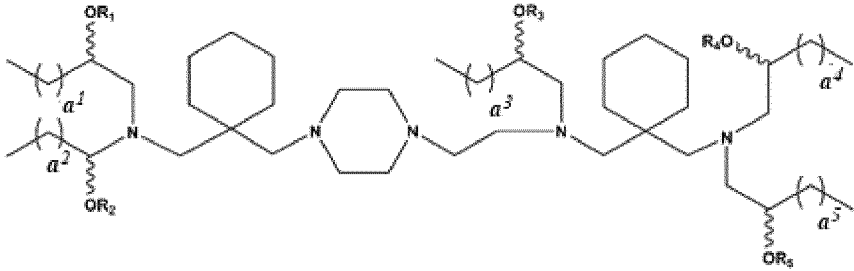
Формула (XI),



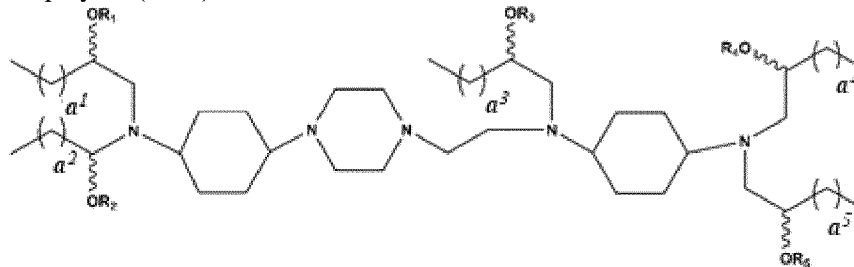
Формула (XII),



Формула (XIII),



Формула (XIV) и



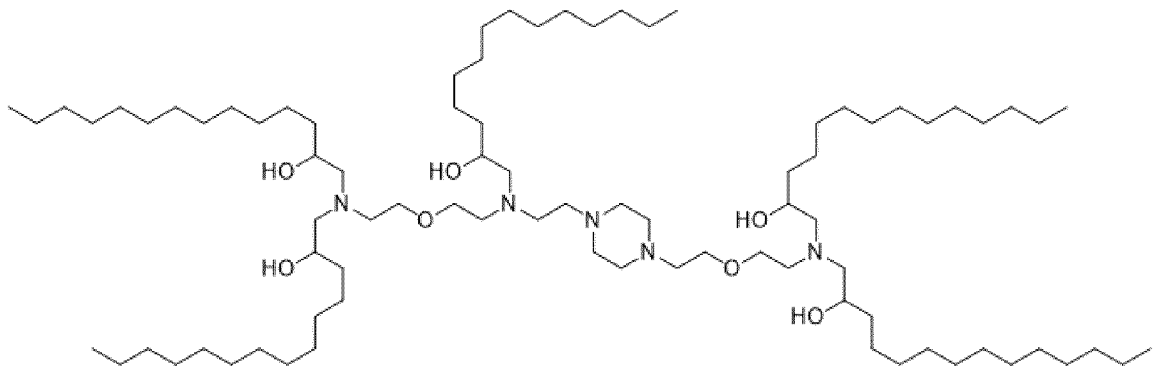
Формула (XV),

в которой:

R_1, R_2, R_3, R_4 и R_5 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1-C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3-C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2-C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2-C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5-C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2-C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6-C_{12} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6-C_{10} арила, необязательно замещенного C_2-C_{12} гетероарила, C_1-C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1-C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1-C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1-C_{28} аминоалкила, C_2-C_{28} аминоалкенила, C_2-C_{28} аминоалкинила, C_6-C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1-C_{28} гидроксиалкила, C_2-C_{28} гидроксиалкенила, C_2-C_{28} гидроксиалкинила, C_6-C_{10} гидроксиарила, C_1-C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата и сложного эфира; и

a^1, a^2, a^3, a^4 и a^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) содержит 1,1'-((2-(2-(4-(2-((2-(2-(бис(2-гидрокситетрадецил)амино)этокси)этил))(2-гидрокситетрадецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этокси)этил)азандиил)бис(тетрадекан-2-ол):



(C14-4).

В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является дексаметазон.

В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет примерно 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет примерно 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или примерно 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет примерно 38,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет менее примерно 38,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет более примерно 38,5% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение примерно 10:1 (холестерин:дексаметазон). В некоторых вариантах осуществления, холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение примерно 10:2 (холестерин:дексаметазон). В некоторых вариантах осуществления, холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение примерно 10:3 (холестерин:дексаметазон). В некоторых вариантах осуществления, холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение примерно 10:4 (холестерин:дексаметазон). В некоторых вариантах осуществления, холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение примерно 10:5 (холестерин:дексаметазон). В некоторых вариантах осуществления, холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение примерно 10:6 (холестерин:дексаметазон). В некоторых вариантах осуществления, холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение примерно 10:7 (холестерин:дексаметазон). В некоторых вариантах осуществления, холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение примерно 10:8

вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет менее примерно 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет более примерно 50% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один ионизируемый липид содержит МСЗ. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один ионизируемый липид содержит С12-200. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид содержит С14-494.

В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или примерно 45% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 10% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет менее примерно 10% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет более примерно 10% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид представляет собой 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPC).

В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или примерно 13% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 1,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет менее примерно 1,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет более примерно 1,5% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (С14PEG-2000).

В некоторых вариантах осуществления, молярное соотношение (a):(b):(c):(d) в LNP составляет примерно 50:10:38,5:1,5.

В некоторых вариантах осуществления, заменитель холестерина представляет собой гидроксизамещенный холестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменитель холестерина представляет собой эпокси-замещенный холестерин. В некоторых вариантах

осуществления, заменитель холестерина представляет собой кето-замещенный холестерин.

В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет примерно 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет примерно 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или примерно 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет примерно 46,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет менее примерно 46,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, холестерин и/или заменитель холестерина составляет более примерно 46,5% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 7- α -гидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 7- β -гидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 19-гидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 20-(S)-гидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 24-(S)-гидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 25-гидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 7-кетохолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 5,6-эпоксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 3 β ,5 α ,6 β -тригидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 4 β -гидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 27-гидроксихолестерин. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является 22-(R)-гидроксихолестерин.

В некоторых вариантах осуществления, молярное процентное соотношение холестерина и заменителя холестерина составляет примерно 0:100 (холестерин:заменитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, молярное процентное соотношение холестерина и заменителя холестерина составляет примерно 5:95 (холестерин:заменитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, молярное процентное соотношение холестерина и заменителя холестерина составляет примерно 10:90 (холестерин:заменитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, молярное процентное соотношение холестерина и заменителя холестерина составляет примерно 12,5:87,5 (холестерин:заменитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, молярное процентное соотношение холестерина и заменителя холестерина составляет примерно 15:85 (холестерин:заменитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления,

некоторых вариантах осуществления, изобретения молярное процентное соотношение холестерина и заместителя холестерина составляет более примерно 70:30 (холестерин:заместитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, изобретения молярное процентное соотношение холестерина и заместителя холестерина составляет более примерно 75:25 (холестерин:заместитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, изобретения молярное процентное соотношение холестерина и заместителя холестерина составляет более примерно 80:20 (холестерин:заместитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, изобретения молярное процентное соотношение холестерина и заместителя холестерина составляет более примерно 85:15 (холестерин:заместитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, изобретения молярное процентное соотношение холестерина и заместителя холестерина составляет более примерно 87,5:12,5 (холестерин:заместитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, изобретения молярное процентное соотношение холестерина и заместителя холестерина составляет более примерно 90:10 (холестерин:заместитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, изобретения молярное процентное соотношение холестерина и заместителя холестерина составляет более примерно 95:5 (холестерин:заместитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, изобретения молярное процентное соотношение холестерина и заместителя холестерина составляет более примерно 100:0 (холестерин:заместитель холестерина).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет примерно 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30., 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет примерно 30% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет менее примерно 30% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет более примерно 30% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид представляет собой C14-494.

В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39,

40, 41, 42, 43, 44 или примерно 45% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 16% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет менее примерно 16% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет более примерно 16% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид представляет собой диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE).

В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или примерно 13% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 2,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет менее примерно 2,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет более примерно 2,5% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (C14PEG-2000).

В некоторых вариантах осуществления, молярное соотношение (a):(b):(c):(d) в LNP составляет примерно 30:16:46,5:2,5.

В некоторых вариантах осуществления, (c) включает холестерин и 7 α -гидроксихолестерин, где молярное соотношение холестерина и 7 α -гидроксихолестерина составляет примерно 50:50 (холестерин:7 α -гидроксихолестерин). В некоторых вариантах осуществления, (c) включает холестерин и 7 α -гидроксихолестерин, где молярное соотношение холестерина и 7 α -гидроксихолестерина составляет менее примерно 50:50 (холестерин:7 α -гидроксихолестерин). В некоторых вариантах осуществления, (c) включает холестерин и 7 α -гидроксихолестерин, где молярное соотношение холестерина и 7 α -гидроксихолестерина составляет более примерно 50:50 (холестерин:7 α -гидроксихолестерин).

В некоторых вариантах осуществления, (c) включает холестерин и 7 α -гидроксихолестерин, где молярное соотношение холестерина и 7 α -гидроксихолестерина составляет примерно 75:25 (холестерин:7 α -гидроксихолестерин). В некоторых вариантах осуществления, (c) включает холестерин и 7 α -гидроксихолестерин, где молярное соотношение холестерина и 7 α -гидроксихолестерина составляет менее примерно 75:25 (холестерин:7 α -гидроксихолестерин). В некоторых вариантах осуществления, (c) включает холестерин и 7 α -гидроксихолестерин, где молярное соотношение холестерина и 7 α -гидроксихолестерина составляет более примерно 75:25 (холестерин:7 α -

(холестерин:заменитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, молярное процентное соотношение холестерина и заменителя холестерина составляет более примерно 95:5 (холестерин:заменитель холестерина). В некоторых вариантах осуществления, молярное процентное соотношение холестерина и заменителя холестерина составляет более примерно 100:0 (холестерин:заменитель холестерина).

В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является хенодезоксихолевая кислота (CDCA). В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является холевая кислота (CA). В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является дезоксихолевая кислота (DCA). В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является литохолевая кислота (LCA). В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является таурохолевая кислота. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является гликохолевая кислота. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является тауроходезоксихолевая кислота. В некоторых вариантах осуществления, заменителем холестерина является гликоходезоксихолевая кислота.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет примерно 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30., 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет примерно 35% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет менее примерно 35% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид составляет более примерно 35% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид представляет собой C14-494.

В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или примерно 45% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет примерно 16% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет менее примерно 16% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид составляет более примерно 16% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, хелперный липид представляет собой диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE).

В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или примерно 100% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или примерно 13% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет примерно 2,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет менее примерно 2,5% моль LNP. В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид составляет более примерно 2,5% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (C14PEG-2000).

В некоторых вариантах осуществления, молярное соотношение (a):(b):(c):(d) в LNP составляет примерно 35:16:46,5:2,5.

Липиды

Используемый в настоящем документе термин «катионный липид» относится к липиду, который является катионным или становится катионным (протонированным), когда pH снижается ниже значения pK ионизируемой группы липида, но становится все более нейтральным при более высоких значениях pH. При значениях pH ниже pK, липид способен связываться с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления, катионный липид содержит цвиттерийонный липид, который приобретает положительный заряд при снижении pH.

В некоторых вариантах осуществления, катионный липид содержит любой из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд при селективном pH, таком как физиологический pH. Такие липиды включают, но не ограничены ими, хлорид N, N-диолеил-N, N-диметиламмония (DODAC); хлорид N-(2,3-диолеилокси)пропил-N, N,N-триметиламмония (DOTMA); бромид N, N-дистеарил-N, N-диметиламмония (DDAB); хлорид N-(2,3-диолеилокси)пропил-N, N,N-триметиламмония (DOTAP); 3-(N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил)холестерин (DC-Chol), трифторацетат N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-2-(сперминкарбоксамидо)этил-N, N-диметиламмония (DOSPA), диоктадециламидоглицилкарбокиспермин (DOGS), 1,2-диолеоил-3-диметиламмоний пропан (DODAP), N, N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA) и бромид N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N, N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE). Кроме того, доступен ряд коммерческих препаратов катионных липидов, которые можно использовать в настоящем изобретении. Они включают, например, LIPOFECTIN® (коммерчески

доступные катионные липосомы, содержащие DOTMA и 1,2-диолеоил-sn-3-фосфозтаноламин (DOPE), от GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y.); LIPOFECTAMINE® (коммерчески доступные катионные липосомы, содержащие трифторацетат N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-(2-(сперминкарбоксамидо)этил)-N, N-диметиламмония (DOSPA) и (DOPE), от GIBCO/BRL); и TRANSFECTAM® (коммерчески доступные катионные липиды, содержащие диоктадециламидоглицилкарбокиспермин (DOGS) в этаноле от Promega Corp., Madison, Wis.). Следующие липиды являются катионными и имеют положительный заряд при pH ниже физиологического: DODAP, DODMA, DMDMA, 1,2-дилинолеилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLenDMA).

В некоторых вариантах осуществления, катионный липид представляет собой аминолипид. Подходящие аминолипиды, полезные в настоящем изобретении, включают аминолипиды, описанные в WO 2012/016184, полностью включенной в настоящий документ в качестве ссылки. Типовые аминолипиды включают, но не ограничены ими, 1,2-дилинолейокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолейокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлорид 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлорид 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ), 3-(N, N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N, N-диолиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N, N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA) и 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA).

В некоторых вариантах осуществления, липид представляет собой ПЭГилированный липид, включая, но не ограничиваясь ими, DSPE-PEG-DBCO, DOPE-PEG-азид, DSPE-PEG-азид, DPPE-PEG-азид, DSPE-PEG-карбоксии-NHS, DOPE-PEG-карбоновая кислота, DSPE-PEG-карбоновая кислота.

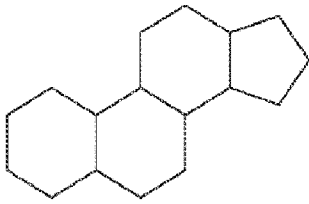
Термин «нейтральный липид» относится к любому из ряда видов липидов, которые существуют либо в незаряженной, либо в нейтральной цвиттерионной форме при физиологическом pH. Типовые нейтральные липиды включают диацилфосфатидилхолины, диацилфосфатидилэтаноламины, церамиды, сфингомиелины, дигидросфингомиелины, цефалины и цереброзиды.

Типовые нейтральные липиды включают, например, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE) и диолеоилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфозтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE)-

малеимид-PEG, дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE)-малеимид-PEG2000, 16-О-монометил PE, 16-О-диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеариоил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE), стеариололеоилфосфатидилхолин (SOPC) и 1,2-диэлаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (трансDOPE). В некоторых вариантах осуществления, нейтральный липид представляет собой 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC).

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит нейтральный липид, выбранный из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM.

«Стероид» представляет собой соединение, содержащее следующий углеродный скелет:



В некоторых вариантах осуществления, стероид или аналог стероида представляет собой холестерин. В некоторых из этих вариантов осуществления, молярное соотношение катионного липида.

Термин «анионный липид» относится к любому липиду, который имеет отрицательный заряд при физиологическом pH. Эти липиды включают фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидную кислоту, N-додеканоилфосфатидилэтаноламины, N-сукцинилфосфатидилэтаноламины, N-глутарилфосфатидилэтаноламины, лизилфосфатидилглицерины, пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG) и другие анионные модифицирующие группы, присоединенные к нейтральным липидам.

Термин «полимер-конъюгированный липид» относится к молекуле, содержащей как липидную часть, так и полимерную часть. Примером полимер-конъюгированного липида является пегилированный липид. Термин «пэгилированный липид» относится к молекуле, содержащей как липидную часть, так и полиэтиленгликолевую часть. Пегилированные липиды известны в данной области техники и включают полиэтиленгликоль (PEG), малеимид PEG (mPEG), DSPE-PEG-DBCO, 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-s-DMG), DOPE-PEG-азид, DSPE-PEG-азид, DPPE-PEG-азид, DSPE-PEG-карбоксии-NHS, DOPE-PEG-карбоновую кислоту, DSPE-PEG-карбоновую кислоту и подобные.

В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит дополнительный стабилизирующий липид, который представляет собой полиэтиленгликоль-липид (пегилированный липид). Подходящие полиэтиленгликоль-липиды включают PEG-модифицированный фосфатидилэтаноламин, PEG-модифицированную фосфатидную кислоту, PEG-модифицированные церамиды (например, PEG-CerC14 или PEG-CerC20), PEG-модифицированные диалкиламины, PEG-модифицированные диацилглицерины,

PEG-модифицированные диалкилглицерины. Типовые полиэтиленгликоль-липиды включают PEG-c-DMG, PEG-c-DMA и PEG-s-DMG. В некоторых вариантах осуществления, полиэтиленгликоль-липид представляет собой N-[(метоксиполи(этиленгликоль)₂₀₀₀)карбамил]-1,2-димиристилоксипропил-3-амин (PEG-c-DMA). В некоторых вариантах осуществления, полиэтиленгликоль-липид представляет собой PEG-c-DMG). В других вариантах осуществления, LNP содержат пегилированный диацилглицерин (PEG-DAG), такой как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG), пегилированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), PEG-сукцинат диацилглицерина (PEG-S-DAG), такой как 4-O-(2',3'-ди(тетрадеканокси)пропил-1-O-(ω -метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG), пегилированный церамид (PEG-cer), или PEG-диалкоксипропилкарбамат, такой как ω -метокси(полиэтокси)этил-N-(2,3-ди(тетрадеканокси)пропил)карбамат или 2,3-ди(тетрадеканокси)пропил-N-(ω -метокси(полиэтокси)этил)карбамат.

В некоторых вариантах осуществления, дополнительный липид присутствует в LNP в количестве от примерно 1% моль до примерно 10% моль. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный липид присутствует в LNP в количестве от примерно 1% моль до примерно 5% моль. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный липид присутствует в LNP в количестве примерно 1% моль или примерно 2,5% моль.

Термин «липидная наночастица» относится к частице, имеющей по меньшей мере один размер порядка нанометров (например, 1-1000 нм), которая включает один или несколько липидов, например, липид Формулы (I) - (XV).

В различных вариантах осуществления, липидные наночастицы имеют средний диаметр от примерно 30 нм до примерно 150 нм, от примерно 40 нм до примерно 150 нм, от примерно 50 нм до примерно 150 нм, от примерно 60 нм до примерно 130 нм, от примерно от примерно 70 нм до примерно 110 нм, от примерно 70 нм до примерно 100 нм, от примерно 80 нм до примерно 100 нм, от примерно 90 нм до примерно 100 нм, от примерно 70 до примерно 90 нм, от примерно 80 нм до примерно 90 нм, от примерно 70 нм до примерно 80 нм или примерно 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм.

В различных вариантах осуществления, липиды или LNP настоящего изобретения по существу нетоксичны.

В различных вариантах осуществления, липиды или LNP, описанные в настоящем документе, составлены для обеспечения стабильности при таргетировании иммунных клеток *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления, LNP, составленная для обеспечения стабильности при таргетировании иммунных клеток *in vivo*, содержит C14-4 в диапазоне концентраций от примерно 10% моль до примерно 45% моль. В некоторых вариантах осуществления, C14-4 присутствует в молярном соотношении примерно 40%.

В некоторых вариантах осуществления, LNP, составленная для обеспечения

стабильности при таргетировании иммунных клеток *in vivo*, содержит фосфолипид в диапазоне концентраций от примерно 10% моль до примерно 45% моль. В некоторых вариантах осуществления, фосфолипид представляет собой диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), и DOPE присутствует в молярном соотношении примерно 25 или в молярном процентном соотношении примерно 25%.

В некоторых вариантах осуществления, LNP, составленная для обеспечения стабильности при таргетировании иммунных клеток *in vivo*, содержит холестерин в диапазоне концентраций от примерно 5% моль до примерно 50% моль. В некоторых вариантах осуществления, холестерин присутствует в молярном соотношении примерно 30 или в молярном процентном соотношении примерно 30%.

В некоторых вариантах осуществления, LNP, составленная для обеспечения стабильности при таргетировании иммунных клеток *in vivo*, содержит общее количество PEG в диапазоне концентраций от примерно 0,5% моль до примерно 12,5% моль. В некоторых вариантах осуществления, общее количество PEG присутствует в молярном соотношении примерно 2,5 или в молярном процентном соотношении примерно 2,5%.

В некоторых вариантах осуществления, LNP, составленная для обеспечения стабильности при таргетировании иммунных клеток *in vivo*, содержит ионизируемый липид C14-4, DOPE, холестерин и общий PEG, где C14-4:DOPE:холестерин:общий PEG присутствуют в молярном соотношении примерно 40:25:30:2,5 или в молярном процентном соотношении примерно 40%:25%:30%:2,5%.

В некоторых вариантах осуществления, общий PEG содержит малеимидный PEG (mPEG) и PEG в молярном соотношении примерно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15 или больше 1:15, или любом молярном соотношении между ними. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит общее количество PEG в молярном соотношении примерно 2,5, где общее количество PEG содержит mPEG и PEG в молярном соотношении 1:3. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит общее количество PEG в молярном соотношении примерно 2,5, и общее количество PEG включает PEG и mPEG в молярном соотношении 1:5. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит общее количество PEG в молярном соотношении примерно 2,5, и общее количество PEG включает PEG и mPEG в молярном соотношении 1:7. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит общее количество PEG в молярном соотношении примерно 2,5, и общее количество PEG включает PEG и mPEG в молярном соотношении 1:10.

Низкомолекулярные терапевтические агенты

В различных вариантах осуществления, агент представляет собой терапевтический агент. В различных вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой малую молекулу. Когда терапевтический агент представляет собой малую молекулу, малую молекулу можно получить, используя стандартные способы, известные специалисту в данной области техники. К таким способам относятся химический органический синтез или биологические средства. Биологические средства включают очистку из биологического

источника, рекомбинантный синтез и системы трансляции *in vitro* с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярные терапевтические агенты включают органическую молекулу, неорганическую молекулу, биомолекулу, синтетическую молекулу и подобные.

В данной области техники хорошо известны комбинаторные библиотеки молекулярно различных химических соединений, потенциально полезных для лечения различных заболеваний и состояний, а также способы создания библиотек. В настоящем способе могут использоваться различные методы, хорошо известные специалисту в данной области техники, включая твердофазный синтез, способы растворения, параллельный синтез отдельных соединений, синтез химических смесей, структуры с жестким ядром, гибкие линейные последовательности, стратегии деконволюции, методы мечения и создание ненаправленных молекулярных ландшафтов для обнаружения лидера по сравнению с направленными структурами для разработки лидера. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент синтезируют и/или идентифицируют с использованием комбинаторных методов.

В общем способе синтеза малой библиотеки, активированную основную молекулу конденсируют с рядом строительных блоков, в результате чего образуется комбинаторная библиотека ковалентно связанных ансамблей основа-строительный блок. Форма и жесткость основы определяют ориентацию строительных блоков в пространстве формы. Библиотеки могут быть направлены путем изменения основы, связей или строительных блоков для таргетирования охарактеризованной биологической структуры («сфокусированные библиотеки») или синтезированы с меньшим структурным направлением с использованием гибких основ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтический агент синтезируют посредством синтеза малой библиотеки.

Описанные в настоящем документе малые молекулы и низкомолекулярные соединения могут присутствовать в виде солей, даже если соли не изображены, и понятно, что изобретение охватывает все соли и сольваты изображенных в настоящем документе терапевтических агентов, а также не солевые и не сольватные формы терапевтических агентов, как хорошо понятно специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, соли терапевтических агентов по изобретению представляют собой фармацевтически приемлемые соли.

Если для любого из терапевтических агентов, описанных в настоящем документе, могут присутствовать таутомерные формы, предполагается, что каждая таутомерная форма будет включена в настоящее изобретение, даже несмотря на то, что только одна или несколько таутомерных форм могут быть изображены явно. Например, когда изображен 2-гидроксипиридиловый фрагмент, также подразумевается соответствующий таутомер 2-пиридона.

Изобретение также включает любую или все стереохимические формы, включая любые энантиомерные или диастереомерные формы описанных терапевтических агентов. Приведенное в настоящем документе описание структуры или названия предназначено для

охвата всех возможных стереоизомеров изображенных терапевтических агентов. Изобретение также охватывает все формы терапевтических агентов, такие как кристаллические или не кристаллические формы терапевтического агента. Также подразумеваются композиции, содержащие терапевтические агенты по изобретению, такие как композиции по существу чистого терапевтического агента, включая его конкретную стереохимическую форму, или композиции, содержащие смеси терапевтических агентов по изобретению в любом соотношении, включая две или несколько стереохимических форм, например, в рацемической или не рацемической смеси.

Изобретение также включает любой или все активные аналоги или производные, такие как пролекарства, любого терапевтического агента, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой пролекарство. В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе малые молекулы являются кандидатами для дериватизации. По существу, в некоторых случаях, аналоги малых молекул, описанных в настоящем документе, которые обладают модулированной активностью, селективностью и растворимостью, включены в настоящий документ и являются полезными лидерами для обнаружения и разработки лекарственных средств. Таким образом, в некоторых случаях, при оптимизации создаются новые аналоги с учетом вопросов доставки лекарственных средств, метаболизма, новизны и безопасности.

В некоторых случаях, описанные в настоящем документе низкомолекулярные терапевтические агенты являются производными или аналогами известных терапевтических агентов, что хорошо известно в области комбинаторной и медицинской химии. Аналоги или производные можно получить путем добавления и/или замены функциональных групп в различных местах. По существу, описанные в настоящем документе малые молекулы могут быть превращены в производные/аналоги с использованием хорошо известных процедур химического синтеза. Например, все атомы водорода или заместители могут быть селективно модифицированы для получения новых аналогов. Кроме того, связывающие атомы или группы могут быть модифицированы в более длинные или более короткие линкеры с углеродными остовами или гетероатомами. Кроме того, кольцевые группы могут быть изменены таким образом, чтобы иметь другое количество атомов в кольце и/или включать гетероатомы. Более того, ароматические соединения могут превращаться в циклические кольца и наоборот. Например, кольца могут состоять из 5-7 атомов и могут быть карбоциклическими или гетероциклическими.

Используемый в настоящем документе термин «аналог», «аналог» или «производное» означает химическое соединение или молекулу, полученную из исходного соединения или молекулы посредством одной или нескольких химических реакций. По существу, аналог может представлять собой структуру, имеющую структуру, аналогичную структуре низкомолекулярных терапевтических агентов, описанных в настоящем документе, или может быть основан на каркасе низкомолекулярных терапевтических агентов, описанных в настоящем документе, но отличаться от него в отношении

определенных компонентов или структурного состава, который может иметь сходное или противоположное метаболическое действие. Аналог или производное любого низкомолекулярного ингибитора в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для лечения заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе низкомолекулярные терапевтические агенты могут быть независимо модифицированы, или их аналоги могут быть получены путем модификации водородных групп независимо друг от друга в другие заместители. То есть, каждый атом каждой молекулы может быть модифицирован независимо по отношению к другим атомам той же молекулы. Можно использовать любую традиционную модификацию для получения производного/аналога. Например, атомы и заместители могут независимо состоять из водорода, алкила, алифатического соединения, алифатического соединения с прямой цепью, алифатического соединения с гетероатомом в цепи, алифатического соединения с разветвленной цепью, замещенного алифатического соединения, циклического алифатического соединения, гетероциклического алифатического соединения, имеющего один или несколько гетероатомов, ароматического соединения, гетероароматического соединения, полиароматического соединения, полиаминокислот, пептидов, полипептидов, их комбинаций, галогенов, галогензамещенных алифатических соединений и подобных. Кроме того, любая кольцевая группа соединения может быть дериватизирована для увеличения и/или уменьшения размера кольца, а также для замены атомов основной цепи на атомы углерода или гетероатомы.

Терапевтические агенты на основе нуклеиновой кислоты

В некоторых вариантах осуществления, композиция по изобретению содержит молекулу РНК, транскрибируемую *in vitro* (IVT). Например, в некоторых вариантах осуществления, композиция по изобретению содержит молекулу РНК IVT, которая кодирует агент. В некоторых вариантах осуществления, молекула РНК IVT настоящей композиции представляет собой молекулу нуклеозид-модифицированной иРНК. В некоторых вариантах осуществления, агент предназначен для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления, молекула РНК IVT кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления, CAR специфичен в отношении связывания с одним или несколькими антигенами. В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит по меньшей мере один вирусный антиген, бактериальный антиген, грибковый антиген, паразитарный антиген, антиген гриппа, опухолеассоциированный антиген, опухолеспецифический антиген или любую их комбинацию.

Однако настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным агентом или комбинацией агентов. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую адъювант. В некоторых вариантах осуществления,

композиция содержит нуклеозид-модифицированную РНК, кодирующую адъювант.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую комбинацию по меньшей мере двух агентов. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит комбинацию двух или нескольких молекул РНК, кодирующих комбинацию двух или нескольких агентов.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает способ индукции иммунного ответа у субъекта. Например, способ можно использовать для обеспечения иммунитета у субъекта против вируса, бактерий, гриба, паразита, рака или подобного. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту композиции, содержащей одну или несколько молекул LNP, составленных для *in vivo* таргетирования иммунной клетки, содержащей одну или несколько РНК, кодирующих по меньшей мере один антиген, адъювант или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает способ редактирования гена иммунной клетки субъекта. Например, способ можно использовать для предоставления одного или нескольких компонентов системы редактирования генов (например, компонента системы CRISPR) в иммунную клетку субъекта. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту композиции, содержащей одну или несколько ионизируемых молекул LNP, составленных для таргетной доставки в Т-клетки, включающих одну или несколько молекул нуклеозид-модифицированной РНК для редактирования генов.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение композиции субъекту. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту множества доз. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение однократной дозы композиции, где однократная доза эффективна для доставки таргетного терапевтического агента.

В других родственных аспектах, терапевтический агент представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой одну из молекулы ДНК или молекулы РНК. В некоторых вариантах осуществления, выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу кДНК, иРНК, миРНК, кшРНК или микроРНК. В некоторых вариантах осуществления, выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует терапевтический пептид, такой как тромбомодулин, рецептор эндотелиального протеина С (EPCR), антитромботические белки, включая активаторы плазминогена и их мутанты, антиоксидантные белки, включая каталазу, супероксиддисмутазу (SOD) и белки, связывающие железо. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой миРНК, микроРНК, кшРНК или антисмысловую молекулу, которая ингибирует таргетируемую нуклеиновую кислоту, включая кодирующие белки, участвующие в обострении патологических процессов.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержит промоторную/регуляторную последовательность, такую, что нуклеиновая кислота

способна управлять экспрессией нуклеиновой кислоты. Таким образом, изобретение охватывает векторы экспрессии и способы введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетки с сопутствующей экспрессией экзогенной нуклеиновой кислоты в клетках, такие как описаны, например, в Sambrook et al. (2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в Ausubel et al. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York), и как описано в настоящем документе в других местах.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК используют для снижения уровня белка-мишени. РНК-интерференция (РНКи) представляет собой явление, при котором введение двухцепочечной РНК (дцРНК) в разнообразные организмы и типы клеток вызывает деградацию комплементарной иРНК. В клетке, длинные дцРНК расщепляются на короткие малые интерферирующие РНК длиной 21-25 нуклеотидов, или миРНК, с помощью рибонуклеазы, известной как Dicer. миРНК впоследствии собираются с белковыми компонентами в РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC), раскручиваясь в процессе. Активированный RISC затем связывается с комплементарным транскриптом посредством взаимодействия спаривания оснований между антисмысловой цепью миРНК и иРНК. Связанная иРНК расщепляется, и сиквенс-специфическая деградация иРНК приводит к сайленсингу генов. См., например, патент США № 6,506,559; Fire et al., 1998, *Nature* 391(19):306-311; Timmons et al., 1998, *Nature* 395:854; Montgomery et al., 1998, *TIG* 14 (7):255-258; David R. Engelke, Ed., *RNA Interference (RNAi) Nuts & Bolts of RNAi Technology*, DNA Press, Eagleville, PA (2003); и Gregory J. Hannon, Ed., *RNAi A Guide to Gene Silencing*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2003). Soutschek et al. (2004, *Nature* 432:173-178) описывают химическую модификацию миРНК, которая способствует внутривенной системной доставке. Оптимизация миРНК включает рассмотрение общего содержания G/C, содержания C/T на концах, Tm и содержания нуклеотидов на 3' липком конце. См., например, Schwartz et al., 2003, *Cell*, 115:199-208 и Khvorova et al., 2003, *Cell* 115:209-216. Следовательно, настоящее изобретение также включает способы снижения уровней РТРN22 с использованием технологии РНКи.

В одном аспекте изобретение включает вектор, содержащий миРНК или антисмысловый полинуклеотид. Предпочтительно, миРНК или антисмысловый полинуклеотид способны ингибировать экспрессию полипептида-мишени. Включение желаемого полинуклеотида в вектор и выбор векторов хорошо известны в данной области техники, как описано, например, в Sambrook et al. (2012) и в Ausubel et al. (1997) и в других местах в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, векторы экспрессии, описанные в настоящем документе, кодируют терапевтические агенты на основе короткой шпилечной РНК (кшРНК). Молекулы кшРНК хорошо известны в данной области техники и направлены против иРНК мишени, тем самым снижая экспрессию мишени. В некоторых вариантах осуществления, кодируемая кшРНК экспрессируется клеткой и затем процессируется в миРНК. Например, в некоторых случаях, клетка обладает нативными

ферментами (например, *dicer*), которые расщепляют кшРНК с образованием миРНК.

Чтобы оценить экспрессию миРНК, кшРНК или антисмыслового полинуклеотида, вектор экспрессии, вводимый в клетку, также может содержать либо селективируемый маркерный ген, либо репортерный ген, либо оба, чтобы облегчить идентификацию экспрессирующих клеток из популяции клеток, рассматриваемых для трансфекции или инфекции с использованием средства доставки по изобретению. В других вариантах осуществления, селективируемый маркер может переноситься на отдельном участке ДНК, а также содержаться в средстве доставки. Как селективируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Полезные селективируемые маркеры известны в данной области техники и включают, например, гены резистентности к антибиотикам, такие как резистентность к неомицину и подобные.

Следовательно, в одном аспекте, средство доставки может содержать вектор, содержащий нуклеотидную последовательность или конструкцию, подлежащую доставке. Выбор вектора будет зависеть от клетки-хозяина, в которую его необходимо впоследствии ввести. В конкретном варианте осуществления, вектор по изобретению представляет собой вектор экспрессии. Подходящие клетки-хозяева включают широкий спектр прокариотических и эукариотических клеток-хозяев. В конкретных вариантах осуществления, вектор экспрессии выбран из группы, состоящей из вирусного вектора, бактериального вектора и вектора клеток млекопитающих. Системы на основе прокариотических и/или эукариотических векторов можно использовать для применения в настоящем изобретении для получения полинуклеотидов или родственных им полипептидов. Многие такие системы коммерчески и широко доступны.

В качестве иллюстрации, вектор, в который введена последовательность нуклеиновой кислоты, может представлять собой плазмиду, которая интегрируется или не интегрируется в геном клетки-хозяина при ее введении в клетку. Иллюстративные неограничивающие примеры векторов, в которые может быть встроена нуклеотидная последовательность по изобретению или генная конструкция по изобретению, включают индуцируемый *tet-on* вектор для экспрессии в эукариотических клетках.

Вектор можно получить обычными способами, известными специалистам в данной области техники (Sambrook et al., 2012). В конкретном варианте осуществления, вектор представляет собой вектор, пригодный для трансформации клеток животных.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные векторы экспрессии могут также содержать молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют пептид или пептидомиметик.

Промотор может быть промотором, естественным образом связанным с геном или полинуклеотидной последовательностью, который можно получить путем выделения 5' некодирующих последовательностей, расположенных выше кодирующего сегмента и/или экзона. Такой промотор можно назвать «эндогенным». Аналогичным образом, энхансер может быть естественным образом связан с полинуклеотидной последовательностью,

расположенной либо ниже, либо выше этой последовательности. Альтернативно, определенные преимущества будут получены путем помещения кодирующего полинуклеотидного сегмента под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который обычно не связан с полинуклеотидной последовательностью в ее естественном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, который обычно не связан с полинуклеотидной последовательностью в ее естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов, а также промоторы или энхансеры, выделенные из любой другой прокариотической, вирусной или эукариотической клетки, а также промоторы или энхансеры, не «встречающиеся в природе», т.е. содержащие разные элементы различных транскрипционных регуляторных областей и/или мутации, которые изменяют экспрессию. Помимо синтетического получения последовательностей нуклеиновых кислот промоторов и энхансеров, последовательности можно получать с использованием технологии рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая PCR™, в связи с раскрытыми в настоящем документе композициями (патент США 4,683,202, патент США 5,928,906). Кроме того, предполагается, что также могут быть использованы контрольные последовательности, которые направляют транскрипцию и/или экспрессию последовательностей в неядерных органеллах, таких как митохондрии, хлоропласты и подобные.

Естественно, будет важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в типе клеток, органелле и организме, выбранных для экспрессии. Специалисты в области молекулярной биологии обычно знают, как использовать промоторы, энхансеры и комбинации типов клеток для экспрессии белков, например, см. Sambrook et al. (2012). Используемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифичными, индуцируемыми и/или полезными в соответствующих условиях, чтобы направлять экспрессию введенного сегмента ДНК на высоком уровне, что является преимуществом при крупномасштабном производстве рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть гетерологичным или эндогенным.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут также содержать селективируемый маркерный ген, который облегчает отбор клеток-хозяев. Подходящими селективируемыми маркерными генами являются гены, кодирующие белки, такие как G418 и гигромицин, который придает резистентность к определенным лекарственным средствам, β -галактозидаза, хлорамфениколацетилтрансфераза, люцифераза светлячка или иммуноглобулин или его часть, такая как Fc часть иммуноглобулина, предпочтительно, IgG. Селективные маркеры могут быть введены в вектор, отдельный от представляющей интерес нуклеиновой кислоты.

После создания полинуклеотида миРНК, специалисту в данной области техники будет понятно, что полинуклеотид миРНК будет иметь определенные характеристики,

которые можно модифицировать для улучшения миРНК как терапевтического соединения. Следовательно, полинуклеотид миРНК может быть дополнительно сконструирован так, чтобы противостоять деградации, путем его модификации для включения фосфоротиоата или других связей, метилфосфоната, сульфона, сульфата, кетила, фосфородитиоата, фосфорамидата, сложных эфиров фосфорной кислоты и подобных (см., например, Agrawal et al., 1987, *Tetrahedron Lett.* 28:3539-3542; Stec et al., 1985 *Tetrahedron Lett.* 26:2191-2194; Moody et al., 1989 *Nucleic Acids Res.* 12:4769-4782; Eckstein, 1989 *Trends Biol. Sci.* 14:97-100; Stein, In: *Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*, Cohen, ed., Macmillan Press, London, pp. 97-117 (1989)).

Любой полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован для повышения его стабильности *in vivo*. Возможные модификации включают, но не ограничены ими, добавление фланкирующих последовательностей на 5' и/или 3' концах; использование фосфоротиоата или 2'-О-метила вместо фосфодиэфирных связей в основной цепи; и/или включение нетрадиционных оснований, таких как инозин, кевозин и вибутозин и подобные, а также ацетил-метил-, тио- и другие модифицированные формы аденина, цитидина, гуанина, тимина и уридина.

В одном варианте осуществления изобретения, антисмысловая последовательность нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется плазмидным вектором, используется в качестве терапевтического агента для ингибирования экспрессии белка-мишени. Антисмысловый вектор экспрессии используют для трансфекции клетки млекопитающего или самого млекопитающего, тем самым вызывая снижение эндогенной экспрессии белка-мишени.

Антисмысловые молекулы и их использование для ингибирования экспрессии генов хорошо известны в данной области техники (см., например, Cohen, 1989, In: *Oligodeoxyribonucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press). Антисмысловые нуклеиновые кислоты представляют собой молекулы ДНК или РНК, которые комплементарны, как этот термин определен в других местах настоящего документа, по меньшей мере части специфической молекулы иРНК (Weintraub, 1990, *Scientific American* 262:40). В клетке, антисмысловые нуклеиновые кислоты гибридизуются с соответствующей иРНК, образуя двухцепочечную молекулу, тем самым ингибируя трансляцию генов.

Использование антисмысловых способов для ингибирования трансляции генов известно в данной области техники и описано, например, в Marcus-Sakura (1988, *Anal. Biochem.* 172:289). Такие антисмысловые молекулы могут быть доставлены в клетку посредством генетической экспрессии с использованием ДНК, кодирующей антисмысловую молекулу, как указано Inoue, 1993, патент США № 5,190,931.

Альтернативно, антисмысловые молекулы по изобретению могут быть получены синтетически и затем доставлены в клетку. Антисмысловые олигомеры, содержащие от примерно 10 до примерно 30, и более предпочтительно, примерно 15 нуклеотидов, являются предпочтительными, поскольку их легко синтезировать и вводить в клетку-

мишень. Синтетические антисмысловые молекулы, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают производные олигонуклеотидов, известные в данной области техники, которые обладают улучшенной биологической активностью по сравнению с не модифицированными олигонуклеотидами (см. патент США № 5,023,243).

В одном варианте осуществления изобретения, рибозим используют в качестве терапевтического агента для ингибирования экспрессии белка-мишени. Рибозимы, полезные для ингибирования экспрессии молекулы-мишени, могут быть сконструированы путем включения последовательностей-мишеней в основную структуру рибозима, которые комплементарны, например, последовательности иРНК, кодирующей молекулу-мишень. Рибозимы, таргетирующие молекулу-мишень, могут быть синтезированы с использованием коммерчески доступных реагентов (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) или они могут быть генетически экспрессированы из кодирующей их ДНК.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент может содержать один или несколько компонентов системы CRISPR-Cas, где направляющая РНК (нРНК), таргетирующая ген, кодирующий молекулу-мишень, и CRISPR-ассоциированный (Cas) пептид образуют комплекс, индуцирующий мутации внутри гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент содержит нРНК или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую нРНК. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент содержит пептид Cas или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид Cas.

В некоторых вариантах осуществления, агент содержит микроРНК или имитатор микроРНК. В некоторых вариантах осуществления, агент содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует микроРНК или имитатор микроРНК.

МикроРНК представляют собой малые некодирующие молекулы РНК, которые способны вызывать пост-транскрипционный сайленсинг определенных генов в клетках путем ингибирования трансляции или путем деградации иРНК-мишени. МикроРНК может быть полностью комплементарной или может иметь область некомплементарности с нуклеиновой кислотой-мишенью, что, как следствие, приводит к «выпуклости» в области некомплементарности. МикроРНК может ингибировать экспрессию генов путем подавления трансляции, например, когда микроРНК не полностью комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени, или путем деградации РНК-мишени, которая, как полагают, происходит только тогда, когда микроРНК связывает свою мишень с идеальной комплементарностью. Настоящее изобретение также может включать двухцепочечные предшественники микроРНК. МикроРНК или пре-микроРНК могут иметь длину от 18 до 100 нуклеотидов или от 18 до 80 нуклеотидов. Зрелые микроРНК могут иметь длину 19-30 нуклеотидов или 21-25 нуклеотидов, в частности, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Предшественники микроРНК обычно имеют длину примерно 70-100 нуклеотидов и имеют конформацию шпильки. МикроРНК генерируются *in vivo* из пре-микроРНК с помощью ферментов Dicer и Drosha, которые специфически перерабатывают длинные пре-микроРНК в функциональные микроРНК. Шпилечные или зрелые микроРНК, или агенты пре-

микроРНК, представленные в настоящем описании, могут быть синтезированы *in vivo* с помощью клеточной системы или *in vitro* посредством химического синтеза.

В различных вариантах осуществления, агент содержит олигонуклеотид, который содержит нуклеотидную последовательность ассоциированной с заболеванием микроРНК. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность ассоциированной с заболеванием микроРНК в форме пре-микроРНК, зрелой или шпилечной форме. В других вариантах осуществления, рассматривается комбинация олигонуклеотидов, содержащая последовательность одной или нескольких ассоциированных с заболеванием микроРНК, любой пре-микроРНК, любого фрагмента или любой их комбинации.

МикроРНК могут быть синтезированы с включением модификации, придающей желаемую характеристику. Например, модификация может улучшить стабильность, термодинамику гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью, таргетирование конкретного типа ткани или клеток или клеточную проницаемость, например, посредством эндоцитоз-зависимого или эндоцитоз-независимого механизма.

Модификации также могут повысить специфичность последовательности и, следовательно, уменьшить таргетирование за пределами сайта. Более подробно способы синтеза и химической модификации описаны ниже. При желании, молекулы микроРНК могут быть модифицированы для стабилизации микроРНК от деградации, увеличения периода полужизни или иного улучшения эффективности. Желательные модификации описаны, например, в патентных публикациях США №№ 20070213292, 20060287260, 20060035254, 20060008822 и 2005028824, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Для повышения нуклеазной резистентности и/или аффинности связывания с мишенью, одноцепочечные олигонуклеотидные агенты, представленные в настоящем описании, могут включать 2'-О-метил, 2'-фтор, 2'-О-метоксиэтил, 2'-О-аминопропил, 2'-амино и/или фосфоротиоатные связи. Включение заблокированных нуклеиновых кислот (LNA), этилен-нуклеиновых кислот (ENA), например, нуклеиновых кислот с 2'-4'-этиленовым мостиком, и определенных модификаций нуклеотидов также может повысить аффинность связывания с мишенью. Включение пиранозных сахаров в основную цепь олигонуклеотида также может уменьшить эндонуклеолитическое расщепление. Олигонуклеотид можно дополнительно модифицировать путем включения 3' катионной группы или путем инвертирования нуклеозида на 3'-конце с помощью 3-3'-связи. В другом альтернативном варианте, 3'-конец может быть заблокирован аминоалкильной группой. Другие 3'-конъюгаты могут ингибировать 3'-5'-экзонуклеолитическое расщепление. Хотя это и не связано с теорией, 3' может ингибировать экзонуклеолитическое расщепление путем пространственного блокирования связывания экзонуклеазы с 3' концом олигонуклеотида. Даже малые алкильные цепи, арильные группы или гетероциклические конъюгаты или модифицированные сахара (D-рибоза, дезоксирибоза, глюкоза и т. д.) могут блокировать 3'-5'-экзонуклеазы.

В некоторых вариантах осуществления, микроРНК включает 2'-модифицированный олигонуклеотид, содержащий олигодезоксинуклеотидные гэпы с некоторыми или всеми межнуклеотидными связями, модифицированными до фосфоротиоатов для нуклеазной резистентности. Наличие модификаций метилфосфоната увеличивает аффинность олигонуклеотида к его РНК-мишени и, таким образом, снижает IC₅₀. Эта модификация также увеличивает нуклеазную резистентность модифицированного олигонуклеотида. Понятно, что способы и реагенты настоящего изобретения можно использовать в сочетании с любыми технологиями, которые могут быть разработаны для повышения стабильности или эффективности ингибирующей молекулы нуклеиновой кислоты.

Молекулы микроРНК включают нуклеотидные олигомеры, содержащие модифицированные основные цепи или межнуклеозидные связи неприродного происхождения. Олигомеры, имеющие модифицированные основные цепи, включают такие, которые сохраняют атом фосфора в основной цепи, и такие, которые не имеют атом фосфора в основной цепи. Для целей настоящего описания, модифицированные олигонуклеотиды, которые не имеют атом фосфора в межнуклеозидной основной цепи, также считаются нуклеотидными олигомерами. Нуклеотидные олигомеры, которые имеют модифицированные олигонуклеотидные основные цепи, включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкил-фосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот.

Описанная в настоящем документе микроРНК, которая может находиться в зрелой или шпилечной форме, может быть представлена в виде голого олигонуклеотида. В некоторых случаях, может быть желательно использовать состав, который способствует доставке микроРНК или другого нуклеотидного олигомера в клетки (см., например, патенты США №№ 5,656,611, 5,753,613, 5,785,992, 6,120,798, 6,221,959, 6,346,613 и 6,353,055, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки).

В некоторых примерах, композиция микроРНК является по меньшей мере частично кристаллической, однородно кристаллической и/или безводной (например, содержит менее 80, 50, 30, 20 или 10% воды). В другом примере, композиция микроРНК находится в водной фазе, например, в растворе, который включает воду. Водная фаза или кристаллические композиции могут быть включены в средство доставки, например, липосому (особенно для водной фазы) или частицу (например, микрочастицу, подходящую для кристаллической композиции). Как правило, композицию микроРНК составляют способом, совместимым с предполагаемым способом введения. Композиция микроРНК может быть составлена в комбинации с другим агентом, например, другим терапевтическим агентом или агентом, который стабилизирует олигонуклеотидный агент, например, белком, который образует комплекс с олигонуклеотидным агентом. Другие агенты включают хелаторы, например,

ЭДТК (например, для удаления двухвалентных катионов, таких как Mg), соли и ингибиторы РНКазы (например, ингибитор РНКазы с широкой специфичностью). В некоторых вариантах осуществления, композиция микроРНК включает другую композицию микроРНК, например, вторую композицию микроРНК (например, микроРНК, которая отличается от первой). Другие препараты могут включать по меньшей мере три, пять, десять, двадцать, пятьдесят или сто или более различных видов олигонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит олигонуклеотидную композицию, которая имитирует активность микроРНК. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит олигонуклеотиды, имеющие нуклеотидные основания, идентичные последовательности нуклеиновых оснований микроРНК, и, таким образом, предназначены для имитации активности микроРНК. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотидная композиция, имитирующая активность микроРНК, содержит молекулу двухцепочечной РНК, которая имитирует зрелые шпильки микроРНК или процессированные дуплексы микроРНК.

В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет идентичность с последовательностями нуклеиновых оснований эндогенной микроРНК или предшественника микроРНК. Олигонуклеотид, выбранный для включения в композицию по настоящему изобретению, может иметь одну из нескольких длин. Такой олигонуклеотид может иметь длину от 7 до 100 связанных нуклеозидов. Например, олигонуклеотид, имеющий идентичность нуклеотидных оснований с микроРНК, может иметь длину от 7 до 30 связанных нуклеозидов. Олигонуклеотид, имеющий идентичность с предшественником микроРНК, может иметь длину до 100 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит от 7 до 30 связанных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29 или 30 связанных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит от 19 до 23 связанных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет длину от 40 до 50, 60, 70, 80, 90 или 100 связанных нуклеозидов.

В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет последовательность, которая имеет определенную идентичность с микроРНК или ее предшественником. Последовательности нуклеиновых оснований зрелых микроРНК и соответствующие им последовательности «стебель-петля», описанные в настоящем документе, представляют собой последовательности, обнаруженные в miRBase, онлайн-базе данных последовательностей и аннотаций микроРНК с возможностью поиска. Записи в базе данных последовательностей miRBase представляют собой спрогнозированную часть транскрипта микроРНК («стебель-петля») с информацией о местоположении и последовательности зрелой последовательности микроРНК. Последовательности «стебель-петля» микроРНК в базе данных не являются строго предшественниками микроРНК (пре-микроРНК) и могут в некоторых случаях включать пре-микроРНК и некоторые фланкирующие последовательности из предполагаемого первичного транскрипта.

Последовательности нуклеиновых оснований микроРНК, описанные в настоящем документе, охватывают любую версию микроРНК, включая последовательности, описанные в версии 10.0 базы данных последовательностей miRBase, и последовательности, описанные в любой более ранней версии базы данных последовательностей miRBase. Выпуск базы данных последовательностей может привести к переименованию некоторых микроРНК. Выпуск базы данных последовательностей может привести к изменению последовательности зрелой микроРНК. Композиции по настоящему изобретению включают олигомерное соединение, содержащее олигонуклеотиды, имеющие определенную идентичность с любой версией последовательности нуклеиновых оснований микроРНК, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, по меньшей мере, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную микроРНК в области 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеиновых оснований. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида может содержать одно или несколько не идентичных нуклеиновых оснований по отношению к микроРНК.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую микроРНК, ее предшественник, миметик или фрагмент. Например, композиция может содержать вирусный вектор, плазмиду, космиду или другой вектор экспрессии, подходящий для экспрессии микроРНК, ее предшественника, миметика или фрагмента в желаемой клетке или ткани млекопитающего.

Вакцина

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает иммуногенную композицию для индукции или активации иммунного ответа у субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления, иммуногенная композиция представляет собой вакцину. В настоящем документе, «иммуногенная композиция» может содержать LNP, содержащую антиген (например, пептид или полипептид), антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающую молекулу), нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген, или антигенсвязывающую молекулу, клетку, экспрессирующую или антигенпрезентирующую или антигенсвязывающую молекулу, или их комбинацию. В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит или кодирует весь или часть любого пептидного антигена или антигенсвязывающей молекулы или их иммуногенно функционального эквивалента. В других вариантах осуществления, композиция содержит смесь молекул иРНК, которая кодирует один или несколько дополнительных иммуностимулирующих агентов. Иммуностимулирующие агенты включают, но не ограничены ими, дополнительный антиген или антигенсвязывающую молекулу, иммуномодулятор или адъювант. В контексте настоящего изобретения, термин «вакцина» относится к веществу, которое индуцирует иммунитет при инокуляции животным.

Вакцина по настоящему изобретению может различаться по составу компонентов нуклеиновой кислоты. В неограничивающем примере, нуклеиновая кислота, кодирующая антиген или антигенсвязывающую молекулу, также может быть составлена с адъювантом. Конечно, следует понимать, что различные композиции, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать дополнительные компоненты. Вакцина по настоящему изобретению и ее различные компоненты могут быть приготовлены и/или введены любым способом, описанным в настоящем документе или известным специалисту в данной области техники, в свете настоящего описания.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтические соединения или композиции по изобретению можно вводить профилактически (т.е. для профилактики заболевания или нарушения) или терапевтически (т.е. для лечения заболевания или нарушения) субъектам, страдающим или подверженным риску (или предрасположенным к) развитию заболевания или нарушения. Такие субъекты могут быть идентифицированы с использованием стандартных клинических методов. В контексте настоящего изобретения, профилактическое введение проводят до проявления явных клинических симптомов заболевания, так что заболевание или нарушение можно предотвратить или, альтернативно, задержать его прогрессирование. В контексте медицины, термин «предотвратить» охватывает любую деятельность, которая снижает бремя смертности или заболеваемости болезнями. Профилактика может осуществляться на первичном, вторичном и третичном уровнях профилактики. В то время как первичная профилактика позволяет избежать развития заболевания, вторичный и третичный уровни профилактики включают мероприятия, направленные на профилактику прогрессирования заболевания и появления симптомов, а также снижение негативного воздействия уже установленного заболевания путем восстановления функции и снижения осложнений, связанных с заболеванием.

Нуклеиновые кислоты

В некоторых вариантах осуществления, изобретение включает ионизируемую молекулу LNP, составленную для таргетной доставки Т-клеток *in vivo*, содержащую или инкапсулирующую одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу иРНК. В некоторых вариантах осуществления, молекула иРНК кодирует CAR. В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная молекула иРНК кодирует CAR. В некоторых вариантах осуществления, изобретение включает нуклеозид-модифицированную молекулу иРНК, кодирующую адъювант.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие CAR, как описано в настоящем документе, альтернативно могут содержать вариации последовательности по отношению к исходным нуклеотидным последовательностям, например, замены, вставки и/или делеции одного или нескольких нуклеотидов, при условии, что полученный полинуклеотид кодирует полипептид по изобретению. Таким образом, объем настоящего изобретения включает нуклеотидные последовательности, которые по существу гомологичны нуклеотидным последовательностям, перечисленным в настоящем документе, и кодируют

представляющий интерес антиген или антигенсвязывающую молекулу или адъювант.

Кроме того, объем изобретения включает нуклеотидные последовательности, которые кодируют аминокислотные последовательности, которые по существу гомологичны аминокислотным последовательностям, перечисленным в настоящем документе, и сохраняют иммуногенную функцию исходной аминокислотной последовательности.

В настоящем документе аминокислотная последовательность является «по существу гомологичной» любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, когда ее аминокислотная последовательность имеет степень идентичности по отношению к аминокислотной последовательности по меньшей мере 60%, преимущественно, по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 85% и более предпочтительно, по меньшей мере 95%. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями предпочтительно, определяют с использованием алгоритма BLASTN (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI/NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410(1990)).

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к конструкции, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления, конструкция содержит множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих множество антигенов. Например, в некоторых вариантах осуществления, конструкция кодирует 1 или более, 2 или более, 5 или более, 10 или более, 15 или более или 20 или более антигенов. В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к конструкции, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую адъювант. В некоторых вариантах осуществления, конструкция содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую адъювант.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит множество конструкций, каждая из которых кодирует один или несколько антигенов. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит 1 или более, 2 или более, 5 или более, 10 или более, 15 или более или 20 или более конструкций. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит первую конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR; и вторую конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую адъювант.

В другом конкретном варианте осуществления, конструкция функционально связана с элементом контроля на уровне трансляции. Конструкция может включать функционально связанную регуляторную последовательность для экспрессии нуклеотидной последовательности по изобретению, образуя, таким образом, кассету экспрессии.

Векторы

Последовательности нуклеиновой кислоты, инкапсулированные в молекуле LNP, таргетирующей иммунные клетки, по настоящему изобретению могут быть получены с использованием рекомбинантных способов, известных в данной области техники, таких

как, например, скрининг библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, который, как известно, включает его, или путем выделения непосредственно из клеток и тканей, содержащих его, с использованием стандартных методов. Альтернативно, представляющая интерес молекула нуклеиновой кислоты может быть получена синтетически.

Нуклеиновую кислоту можно клонировать во множество типов векторов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, включающий, но не ограниченный ими, плазмиду, фагемиду, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы для генерации зондов, векторы для секвенирования и векторы, оптимизированные для транскрипции *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления, композиция по изобретению содержит РНК, кодирующую CAR, транскрибируемую *in vitro* (IVT). В некоторых вариантах осуществления, композиция по изобретению содержит РНК IVT, кодирующую множество антигенов. В некоторых вариантах осуществления, композиция по изобретению содержит РНК IVT, кодирующую адъювант. В некоторых вариантах осуществления, композиция по изобретению содержит РНК IVT, кодирующую один или несколько антигенов, и один или несколько адъювантов.

Нуклеозид-модифицированная РНК

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит нуклеозид-модифицированную РНК. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит нуклеозид-модифицированную иРНК. Нуклеозид-модифицированная иРНК имеет особые преимущества перед не модифицированной иРНК, включая, например, повышенную стабильность, низкую или отсутствующую врожденную иммуногенность и усиленную трансляцию. Нуклеозид-модифицированная иРНК, используемая в настоящем изобретении, дополнительно описана в патенте США № 8,278,036, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная иРНК не активирует какие-либо патофизиологические пути, транслируется очень эффективно и почти сразу после доставки и служит матрицей для непрерывного продуцирования белка *in vivo*, продолжающегося в течение нескольких дней (Kariko et al., 2008, Mol Ther 16:1833-1840; Kariko et al., 2012, Mol Ther 20:948-953). Количество иРНК, необходимое для оказания физиологического эффекта, невелико, что делает ее применимой для терапии человека. В некоторых вариантах осуществления, иммунную клетку, содержащую экспрессирующую молекулу иРНК, кодирующую CAR, направляют на представляющую интерес клетку, экспрессирующую антиген, специфически связывающийся с CAR.

В некоторых случаях экспрессия белка путем доставки кодирующей иРНК имеет множество преимуществ по сравнению со способами, в которых используются белки, плазмидные ДНК или вирусные векторы. Во время трансфекции иРНК, кодирующая последовательность желаемого белка является единственным веществом, доставляемым в

клетки, что позволяет избежать всех побочных эффектов, связанных с плазмидным остовом, вирусными генами и вирусными белками. Что еще более важно, в отличие от векторов на основе ДНК и вирусов, иРНК не несет риска включения в геном, и продуцирование белка начинается сразу после доставки иРНК. Например, высокие уровни циркулирующих белков были измерены в течение 15-30 минут после инъекции кодирующей иРНК *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, использование иРНК вместо белка также имеет множество преимуществ. Периоды полужизни белков в кровообращении часто короткие, поэтому лечение белками требует частого дозирования, в то время как иРНК обеспечивает основу для непрерывного продуцирования белка в течение нескольких дней. Очистка белков проблематична, и они могут содержать агрегаты и другие примеси, вызывающие побочные эффекты (Kromminga and Schellekens, 2005, *Ann NY Acad Sci* 1050:257-265).

В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная РНК содержит природный нуклеозид-модифицированный псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления, включение псевдоуридина делает иРНК более стабильной, не иммуногенной и хорошо транскрибируемой (Kariko et al., 2008, *Mol Ther* 16:1833-1840; Anderson et al., 2010, *Nucleic Acids Res* 38:5884-5892; Anderson et al., 2011, *Nucleic Acids Research* 39:9329-9338; Kariko et al., 2011, *Nucleic Acids Research* 39:e142; Kariko et al., 2012, *Mol Ther* 20:948-953; Kariko et al., 2005, *Immunity* 23:165-175).

Было продемонстрировано, что присутствие модифицированных нуклеозидов, в том числе псевдоуридинов, в РНК подавляет их врожденную иммуногенность (Kariko et al., 2005, *Immunity* 23:165-175). Кроме того, кодирующая белок, транскрибируемая *in vitro* РНК, содержащая псевдоуридин, может транслироваться более эффективно, чем РНК, не содержащая или содержащая другие модифицированные нуклеозиды (Kariko et al., 2008, *Mol Ther* 16:1833-1840). Впоследствии было показано, что присутствие псевдоуридина улучшает стабильность РНК (Anderson et al., 2011, *Nucleic Acids Research* 39:9329-9338) и ослабляет как активацию PKR, так и ингибирование трансляции (Anderson et al., 2010, *Nucleic Acids Res* 38:5884-5892). Была разработана процедура очистки препаративной ВЭЖХ, которая имеет решающее значение для получения псевдоуридин-содержащей РНК, обладающей превосходным трансляционным потенциалом и не обладающей врожденной иммуногенностью (Kariko et al., 2011, *Nucleic Acids Research* 39:e142). Введение мышам и макакам очищенной ВЭЖХ псевдоуридин-содержащей РНК, кодирующей эритропоэтин, приводило к значительному увеличению уровней ЭПО в сыворотке крови (Kariko et al., 2012, *Mol Ther* 20:948-953), тем самым подтверждая, что псевдоуридин-содержащая иРНК подходит для белковой терапии *in vivo*.

Настоящее изобретение охватывает молекулы РНК, олигорибонуклеотидов и полирибонуклеотидов, содержащие псевдоуридин или модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген или антигенсвязывающую молекулу, где нуклеиновая кислота содержит псевдоуридин или модифицированный нуклеозид. В некоторых

вариантах осуществления, композиция содержит вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген, антигенсвязывающую молекулу, адъювант или их комбинацию, где нуклеиновая кислота содержит псевдоуридин или модифицированный нуклеозид.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная РНК по настоящему изобретению представляет собой РНК IVT. Например, в некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированную РНК синтезируют РНК-полимеразой фага T7. В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированную иРНК синтезируют РНК-полимеразой фага SP6. В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированную РНК синтезируют РНК-полимеразой фага T3.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой $m^1\text{acr}^3\text{U}$ (1-метил-3-(3-амино-3-карбоксивпропил)псевдоуридин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой $m^1\text{U}$ (1-метилпсевдоуридин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой Ψm (2'-О-метилпсевдоуридин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой $m^5\text{D}$ (5-метилдигидроуридин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой $m^3\text{U}$ (3-метилпсевдоуридин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой псевдоуридиновый фрагмент, который дополнительно не модифицирован. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой монофосфат, дифосфат или трифосфат любого из вышеуказанных псевдоуридинов. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой любой другой псевдоуридин-подобный нуклеозид, известный в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид, модифицированный в нуклеозид-модифицированной РНК по настоящему изобретению, представляет собой уридин (U). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой цитидин (C). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой аденозин (A). В другом варианте осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой гуанозин (G).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид настоящего изобретения представляет собой $m^5\text{C}$ (5-метилцитидин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой $m^5\text{U}$ (5-метилуридин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой $m^6\text{A}$ (N^6 -метиладенозин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой $s^2\text{U}$ (2-тиоуридин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой Ψ (псевдоуридин). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет собой Um (2'-О-метилуридин).

В других вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид представляет

собой m^1A (1-метиладенозин); m^2A (2-метиладенозин); Am (2'-О-метиладенозин); ms^2m^6A (2-метилтио- N^6 -метиладенозин); i^6A (N^6 -изопентениладенозин); ms^2i^6A (2-метилтио- N^6 -изопентениладенозин); io^6A (N^6 -(цис-гидроксиизопентенил)аденозин); ms^2io^6A (2-метилтио- N^6 -(цис-гидроксиизопентенил)аденозин); g^6A (N^6 -глицинилкарбамоиладенозин); t^6A (N^6 -треонилкарбамоиладенозин); ms^2t^6A (2-метилтио- N^6 -треонилкарбамоиладенозин); m^6t^6A (N^6 -метил- N^6 -треонилкарбамоиладенозин); hn^6A (N^6 -гидроксинорвалилкарбамоиладенозин); ms^2hn^6A (2-метилтио- N^6 -гидроксинорвалилкарбамоиладенозин); $Ar(p)$ (2'-О-рибозиладенозин(фосфат)); I (инозин); m^1I (1-метиинозин); m^1Im (1,2'-О-диметиинозин); m^3C (3-метилцитидин); Cm (2'-О-метилцитидин); s^2C (2-тиоцитидин); ac^4C (N^4 -ацетилцитидин); f^5C (5-формилцитидин); m^5Cm (5,2'-О-диметилцитидин); ac^4Cm (N^4 -ацетил-2'-О-метилцитидин); k^2C (лизидин); m^1G (1-метилгуанозин); m^2G (N^2 -метилгуанозин); m^7G (7-метилгуанозин); Gm (2'-О-метилгуанозин); m^2_2G (N^2, N^2 -диметилгуанозин); m^2Gm ($N^2, 2'$ -О-диметилгуанозин); m^2_2Gm ($N^2, N^2, 2'$ -О-триметилгуанозин); $Gr(p)$ (2'-О-рибозилгуанозин (фосфат)); yW (вибутозин); o_2yW (пероксивибутозин); $OHyW$ (гидроксивибутозин); $OHyW^*$ (недомодифицированный гидроксивибутозин); imG (виозин); $mimG$ (метилвиозин); Q (кеуозин); oQ (эпоксикеуозин); $galQ$ (галактозилкеуозин); $manQ$ (маннозилкеуозин); $preQ_0$ (7-циано-7-деазагуанозин); $preQ_1$ (7-аминометил-7-деазагуанозин); G^+ (археозин); D (дигидроуридин); m^5Um (5,2'-О-диметилуридин); s^4U (4-тиоуридин); m^5s^2U (5-метил-2-тиоуридин); s^2Um (2-тио-2'-О-метилуридин); acr^3U (3-(3-амино-3-карбоксыпропил)уридин); ho^5U (5-гидроксиуридин); mo^5U (5-метоксиуридин); smo^5U (уридин-5-оксиуксусная кислота); $msmo^5U$ (метилловый эфир уридин-5-оксиуксусной кислоты); chm^5U (5-(карбоксыгидроксиметил)уридин); $mchm^5U$ (метилловый эфир 5-(карбоксыгидроксиметил)уридина); mcm^5U (5-метоксикарбонилметилуридин); mcm^5Um (5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилуридин); mcm^5s^2U (5-метоксикарбонилметил-2-тиоуридин); nm^5s^2U (5-аминометил-2-тиоуридин); mnm^5U (5-метиламинометилуридин); mnm^5s^2U (5-метиламинометил-2-тиоуридин); mnm^5se^2U (5-метиламинометил-2-селенуридин); ncm^5U (5-карбамоилметилуридин); ncm^5Um (5-карбамоилметил-2'-О-метилуридин); $cmnm^5U$ (5-карбоксыметиламинометилуридин); $cmnm^5Um$ (5-карбоксыметиламинометил-2'-О-метилуридин); $cmnm^5s^2U$ (5-карбоксыметиламинометил-2-тиоуридин); m^6_2A (N^6, N^6 -диметиладенозин); Im (2'-О-метиинозин); m^4C (N^4 -метилцитидин); m^4Cm ($N^4, 2'$ -О-диметилцитидин); hm^5C (5-гидроксиметилцитидин); m^3U (3-метилуридин); cm^5U (5-карбоксыметилуридин); m^6Am ($N^6, 2'$ -О-диметиладенозин); m^6_2Am ($N^6, N^6, O-2'$ -триметиладенозин); $m^{2,7}G$ ($N^{2,7}$ -диметилгуанозин); $m^{2,2,7}G$ ($N^2, N^2, 7$ -триметилгуанозин); m^3Um (3,2'-О-диметилуридин); m^5D (5-метилдигидроуридин); f^5Cm (5-формил-2'-О-метилцитидин); m^1Gm (1,2'-О-диметилгуанозин); m^1Am (1,2'-О-диметиладенозин); tm^5U (5-тауринометилуридин); tm^5s^2U (5-тауринометил-2-тиоуридин); $imG-14$ (4-деметилвиозин); $imG2$ (изовиозин); или ac^6A (N^6 -ацетиладенозин).

В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная РНК по настоящему изобретению содержит комбинацию 2 или нескольких из вышеуказанных

доля составляет менее 4%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 6%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 12%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 15%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 20%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 30%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 40%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 50%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 60%. В некоторых вариантах осуществления, эта доля составляет менее 70%.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная РНК по настоящему изобретению транслируется в клетке более эффективно, чем не модифицированная молекула РНК с той же последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная РНК проявляет повышенную способность к трансляции клеткой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 2 раза по сравнению с ее не модифицированным аналогом. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 3 раза. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 5 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 7 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 10 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 15 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 20 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 50 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 100 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 200 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 500 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в 2000 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 10-1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 10-100 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 10-200 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 10-300 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 10-500 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 20-1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 30-1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 50-1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 100-1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, увеличение составляет 200-1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, трансляция усиливается в любое другое значительное количество или диапазон количеств раз.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная РНК, кодирующая антиген, по настоящему изобретению индуцирует значительно более сильный адаптивный иммунный ответ, чем не модифицированная молекула РНК, синтезированная *in vitro*, с той же последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная молекула РНК демонстрирует адаптивный иммунный ответ, который в

2 раза сильнее, чем ее не модифицированный аналог. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 3 раза. В другом варианте осуществления адаптивный иммунный ответ увеличивается в 5 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 7 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 10 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 15 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 20 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 50 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 100 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 200 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 500 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в 2000 раз. В некоторых вариантах осуществления, адаптивный иммунный ответ усиливается в другое количество раз.

В некоторых вариантах осуществления, термин «индуцирует значительно больший адаптивный иммунный ответ» относится к обнаруживаемому усилению адаптивного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления, этот термин относится к кратному увеличению адаптивного иммунного ответа (например, к 1-кратному увеличению, перечисленному выше). В некоторых вариантах осуществления, термин относится к увеличению, при котором нуклеозид-модифицированную РНК можно вводить с более низкой дозой или частотой, чем не модифицированную молекулу РНК того же вида, все еще индуцируя эффективный адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления, увеличение таково, что нуклеозид-модифицированную РНК можно вводить с использованием однократной дозы для индукции эффективного адаптивного иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеозид-модифицированная РНК по настоящему изобретению демонстрирует значительно меньшую врожденную иммуногенность, чем не модифицированная молекула РНК, синтезированная *in vitro*, с той же последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная молекула РНК демонстрирует врожденный иммунный ответ, который в 2 раза меньше, чем ее не модифицированный аналог. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 3 раза. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 5 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 7 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 10 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 15 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 20 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 50 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 100 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная

иммуногенность снижается в 200 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 500 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в 2000 раз. В некоторых вариантах осуществления, врожденная иммуногенность снижается в другое количество раз.

В некоторых вариантах осуществления, термин «демонстрирует значительно меньшую врожденную иммуногенность» относится к обнаруживаемому снижению врожденной иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления, этот термин относится к кратному снижению врожденной иммуногенности (например, 1-кратному снижению из перечисленных выше). В некоторых вариантах осуществления, этот термин относится к снижению, при котором эффективное количество нуклеозид-модифицированной РНК может быть введено без запуска обнаруживаемого врожденного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления, этот термин относится к снижению, при котором нуклеозид-модифицированную РНК можно вводить повторно, не вызывая врожденного иммунного ответа, достаточного для заметного снижения продуцирования рекомбинантного белка. В некоторых вариантах осуществления, снижение таково, что нуклеозид-модифицированную РНК можно вводить повторно, не вызывая врожденного иммунного ответа, достаточного для устранения обнаруживаемого продуцирования рекомбинантного белка.

Полипептидные терапевтические агенты

В других родственных аспектах терапевтический агент включает выделенный пептид, который модулирует мишень. Например, в некоторых вариантах осуществления, пептид по изобретению ингибирует или активирует мишень непосредственно путем связывания с мишенью, модулируя тем самым нормальную функциональную активность мишени. В некоторых вариантах осуществления, пептид по изобретению модулирует мишень, конкурируя с эндогенными белками. В некоторых вариантах осуществления, пептид по изобретению модулирует активность мишени, действуя как трансдоминантно-отрицательный мутант.

Варианты полипептидных терапевтических агентов могут быть (i) такими, в которых один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативным или не консервативным аминокислотным остатком (предпочтительно, консервативным аминокислотным остатком), и такой замещенный аминокислотный остаток может быть или не быть полипептидом, кодируемым генетическим кодом, (ii) такими, в которых имеется один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, например, остатков, которые модифицированы путем присоединения замещающих групп, (iii) такими, в которых полипептид представляет собой альтернативный сплайсинговый вариант полипептида по настоящему изобретению, (iv) фрагментами полипептидов и/или (v) такими, в которых полипептид слит с другим полипептидом, таким как лидерная или секреторная последовательность или последовательность, которая используется для очистки (например, His-метка) или для обнаружения (например, Sv5 эпитопная метка).

Фрагменты включают полипептиды, полученные посредством протеолитического расщепления (включая мультисайтовый протеолиз) исходной последовательности. Варианты могут быть пост-трансляционно или химически модифицированными. Считается, что такие варианты находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники, исходя из представленных в настоящем документе идей.

CAR агенты

В некоторых вариантах осуществления, молекула иРНК по изобретению кодирует химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен представляет собой таргетирующий домен, где таргетирующий домен направляет Т-клетку, экспрессирующую CAR, к конкретной клетке или ткани, представляющей интерес. Например, в некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен содержит антитело, фрагмент антитела или пептид, который специфически связывается с экспрессируемым на патогенном организме или опухолевой клетке, тем самым направляя Т-клетку, экспрессирующую CAR, на клетку или ткань, экспрессирующую антиген.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к LNP, таргетирующей иммунные клетки, содержащей агент, где агент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, агент содержит молекулу иРНК, кодирующую CAR. В некоторых вариантах осуществления, агент содержит нуклеозид-модифицированную молекулу иРНК, кодирующую CAR.

В различных вариантах осуществления, CAR может представлять собой CAR «первого поколения», «второго поколения», «третьего поколения», «четвертого поколения» или «пятого поколения» (см., например, Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3(4):388-398 (2013); Jensen et al., *Immunol. Rev.* 257:127-133 (2014); Sharpe et al., *Dis. Model Mech.* 8(4):337-350 (2015); Brentjens et al., *Clin. Cancer Res.* 13:5426-5435 (2007); Gade et al., *Cancer Res.* 65:9080-9088 (2005); Maher et al., *Nat. Biotechnol.* 20:70-75 (2002); Kershaw et al., *J. Immunol.* 173:2143-2150 (2004); Sadelain et al., *Curr. Opin. Immunol.* (2009); Hollyman et al., *J. Immunother.* 32:169-180 (2009)).

CAR «первого поколения» для использования в настоящем изобретении содержат антигенсвязывающий домен, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), слитый с трансмембранным доменом, который слит с цитоплазматическим/внутриклеточным доменом цепи Т-клеточного рецептора. CAR «первого поколения» обычно имеют внутриклеточный домен CD3 ζ -цепи, который является основным передатчиком сигналов от эндогенных Т-клеточных рецепторов (TCR). CAR «первого поколения» могут обеспечивать распознавание антигена *de novo* и вызывать активацию как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток через их сигнальный домен цепи CD3 ζ в одной слитой молекуле, независимо от HLA-опосредованной презентации антигена.

CAR «второго поколения» для использования в настоящем изобретении содержат

антигенсвязывающий домен, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), слитый с внутриклеточным сигнальным доменом, способным активировать Т-клетки, и костимулирующий домен, предназначенный для увеличения активности и резистентности Т-клеток (Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3:388-398 (2013)). Таким образом, дизайн CAR может сочетать распознавание антигена с передачей сигнала, две функции, которые физиологически выполняются двумя отдельными комплексами, гетеродимером TCR и комплексом CD3. CAR «второго поколения» включают внутриклеточный домен из различных костимулирующих молекул, например, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40 и подобных, в цитоплазматическом хвосте CAR для подачи дополнительных сигналов клетке.

CAR «второго поколения» обеспечивают как костимуляцию, например, доменами CD28 или 4-1BB, так и активацию, например, сигнальным доменом CD3 ζ . Доклинические исследования показали, что CAR «второго поколения» могут улучшить противоопухолевую активность Т-клеток. Например, высокая эффективность CAR-модифицированных Т-клеток «второго поколения» была продемонстрирована в клинических испытаниях, таргетирующих молекулу CD19, у пациентов с хроническим лимфобластным лейкозом (CLL) и острым лимфобластным лейкозом (ALL) (Davila et al., *Oncoimmunol.* 1(9):1577-1583 (2012)).

CAR «третьего поколения» обеспечивают множественную костимуляцию, например, за счет включения как доменов CD28, так и 4-1BB, и активацию, например, за счет включения домена активации CD3 ζ .

CAR «четвертого поколения» обеспечивают костимуляцию, например, доменами CD28 или 4-1BB, и активацию, например, сигнальным доменом CD3 ζ в дополнение к конститутивному или индуцируемому хемокиновому компоненту.

CAR «пятого поколения» обеспечивают костимуляцию, например, доменами CD28 или 4-1BB, и активацию, например, сигнальным доменом CD3 ζ , конститутивным или индуцируемым хемокиновым компонентом и внутриклеточным доменом цитокинового рецептора, например, IL-2R β .

В различных вариантах осуществления, CAR может быть включен в мультивалентную систему CAR, например, систему DualCAR или систему «TandemCAR». Мультивалентные системы CAR включают системы или клетки, содержащие множество CAR, и системы или клетки, содержащие двухвалентные/биспецифические CAR, таргетирующие более одного антигена.

В вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, CAR обычно содержат антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, как описано выше. В конкретном неограничивающем варианте осуществления, антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, специфичный к связыванию с поверхностным антигеном представляющей интерес клетки-мишени (например, патогена или опухолевой клетки).

Комбинации

В некоторых вариантах осуществления, композиция по настоящему изобретению

содержит комбинацию агентов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, композиция, содержащая комбинацию агентов, описанную в настоящем документе, оказывает аддитивный эффект, где общий эффект комбинации приблизительно равен сумме эффектов каждого отдельного агента. В других вариантах осуществления, композиция, содержащая комбинацию агентов, описанную в настоящем документе, обладает синергическим эффектом, где общий эффект комбинации превышает сумму эффектов каждого отдельного агента.

Композиция, содержащая комбинацию агентов, содержит отдельные агенты в любом подходящем соотношении. Например, в некоторых вариантах осуществления, композиция содержит два отдельных агента в соотношении 1:1. Однако комбинация не ограничивается каким-либо конкретным соотношением. Скорее, в настоящий документ входит любое соотношение, эффективность которого доказана.

Домен, таргетирующий клетку

В различных вариантах осуществления изобретения, LNP по изобретению конъюгирована с таргетирующим доменом, специфичным для связывания с рецептором клетки-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой стволовую клетку. Типовые стволовые клетки, которые могут быть таргетированы композициями по настоящему изобретению, включают, но не ограничены ими, гемопоэтические стволовые клетки и стволовые клетки, родственные гемопоэтическим стволовым клеткам (например, миелоидные стволовые клетки и лимфоидные стволовые клетки).

В некоторых вариантах осуществления, клетка-мишень представляет собой мононуклеарную клетку периферической крови (PBMC).

В одной клетке, клеткой-мишенью является иммунная клетка. Типовые иммунные клетки, которые могут быть таргетированы композициями по изобретению, включают, но не ограничены ими, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, антигенпрезентирующие клетки, дендритные клетки, макрофаги, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы. В некоторых вариантах осуществления, иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, которые могут быть таргетированы композициями по настоящему изобретению, могут представлять собой CD4⁺ или CD8⁺ и могут включать, но не ограничены ими, Т-хелперные клетки (CD4⁺), цитотоксические Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-лимфоцитами, CTL; CD8-Т-клетками) и Т-клетки памяти, включая центральные Т-клетки памяти (TCM), стволовые Т-клетки памяти (TSCM), Т-клетки памяти, подобные стволовым клеткам (или Т-клетки памяти, подобные стволовым), и эффекторные Т-клетки памяти, например, T_{EM} клетки и T_{EMRA} (CD45RA⁺) клетки, эффекторные Т-клетки, Th1 клетки, Th2 клетки, Th9 клетки, Th17 клетки, Th22 клетки, T_{fh} (фолликулярные хелперы) клетки, Т-регуляторные клетки, естественные киллерные Т-клетки, ассоциированные со слизистой инвариантные Т-клетки (MAIT), и $\gamma\delta$ Т-клетки. Основные подтипы Т-клеток включают T_N (наивные), T_{SCM} (стволовые клетки

памяти), T_{CM} (центральной памяти), T_{TM} (переходной памяти), T_{EM} (эффекторной памяти) и T_{TE} (терминальный эффектор), TCR-трансгенные Т-клетки, Т-клетки, перенаправленные для универсального цитокин-опосредованного уничтожения (TRUCK), Т-клетки, инфильтрирующие опухоль (TIL), CAR-Т-клетки или любые Т-клетки, которые можно использовать для лечения заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки по изобретению представляют собой иммуностимулирующие клетки, т.е. клетки, которые опосредуют иммунный ответ. Типовые Т-клетки, которые являются иммуностимулирующими, включают, но не ограничены ими, Т-хелперные клетки (CD4+), цитотоксические Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-лимфоцитами, CTL; CD8+ Т-клетками) и Т-клетки памяти, включая центральные Т-клетки памяти (TCM), стволовые Т-клетки памяти (TSCM), Т-клетки памяти, подобные стволовым клеткам (или Т-клетки памяти, подобные стволовым) и эффекторные Т-клетки памяти, например, клетки TEM и клетки TEMRA (CD45RA+), эффекторные Т-клетки, Th1 клетки, Th2 клетки, Th9 клетки, Th17 клетки, Th22 клетки, Tfh клетки (фолликулярные хелперы), естественные киллерные Т-клетки, ассоциированные со слизистой инвариантные Т-клетки (MAIT) и $\gamma\delta$ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, домен, таргетирующий Т-клетки, связывается с CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD38, CD39, CD40L, CD44, CD45, CD62L, CD69, CD73, CD80, CD83, CD86, CD95, CD103, CD119, CD126, CD150, CD153, CD154, CD161, CD183, CD223, CD254, CD275, CD45RA, CXCR3, CXCR5, FasL, IL18R1, CTLA-4, OX40, GITR, LAG3, ICOS, PD-1, leu-12, TCR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, NKG2D, CCR, CCR1, CCR2, CCR4, CCR6 или CCR7.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим комбинацию средств доставки, конъюгированных с доменами, таргетирующими иммунные клетки, для таргетирования множества иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления, комбинация содержит два или несколько средств доставки, таргетирующих иммунные клетки, таргетирующих два или несколько антигенов иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления, два или несколько антигенов иммунных клеток выбраны из CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD38, CD39, CD40L, CD44, CD45, CD62L, CD69, CD73, CD80, CD83, CD86, CD95, CD103, CD119, CD126, CD150, CD153, CD154, CD161, CD183, CD223, CD254, CD275, CD45RA, CXCR3, CXCR5, FasL, IL18R1, CTLA-4, OX40, GITR, LAG3, ICOS, PD-1, leu-12, TCR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, NKG2D, CCR, CCR1, CCR2, CCR4, CCR6 и CCR7. В некоторых вариантах осуществления, комбинация включает два или несколько средств доставки, таргетирующих Т-клетки, таргетирующих поверхностный антиген CD4+ Т-клетки и поверхностный антиген CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, комбинация включает два или несколько средств доставки, таргетирующих Т-клетки, таргетирующих CD4 и CD8.

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен конъюгирован с LNP по изобретению. Типовые способы конъюгации могут включать, но не ограничены ими,

ковалентные связи, электростатические взаимодействия и гидрофобные («ван-дер-ваальсовы») взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления, конъюгация представляет собой обратимую конъюгацию, так что средство доставки может быть диссоциировано от таргетирующего домена при воздействии определенных условий или химических агентов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгация представляет собой необратимую конъюгацию, так что в нормальных условиях средство доставки не диссоциирует от таргетирующего домена.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгация включает ковалентную связь между активированным липидом, конъюгированным с полимером, и таргетирующим доменом. Термин «активированный липид, конъюгированный с полимером» относится к молекуле, содержащей липидную часть и полимерную часть, которая была активирована посредством функционализации липида, конъюгированного с полимером, первой связывающей группой. В некоторых вариантах осуществления, активированный липид, конъюгированный с полимером, содержит первую связывающую группу, способную реагировать со второй связывающей группой. В некоторых вариантах осуществления, активированный липид, конъюгированный с полимером, представляет собой активированный пегилированный липид. В некоторых вариантах осуществления, первая связывающая группа связана с липидной частью пегилированного липида. В некоторых вариантах осуществления, первая связывающая группа связана с полиэтиленгликолевой частью пегилированного липида. В некоторых вариантах осуществления, вторая функциональная группа ковалентно присоединена к таргетирующему домену.

Первая связывающая группа и вторая связывающая группа могут представлять собой любые функциональные группы, известные специалистам в данной области техники, которые вместе образуют ковалентную связь, например, в мягких условиях реакции или физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления, первая связывающая группа или вторая связывающая группа выбраны из группы, состоящей из малеимидов, сложных эфиров N-гидроксисукцинимиды (NHS), карбодиимидов, гидразида, сложных эфиров пентафторфенила (PFP), фосфинов, гидроксиметилфосфинов, псоралена, сложных имидоэфиров, пиридилдисульфида, изоцианатов, винилсульфонов, альфа-галогенацетил, арилазидов, ацилазидов, алкилазидов, диазиринов, бензофенона, эпоксидов, карбонатов, ангидридов, сульфонилхлоридов, циклооктина, альдегидов и сульфгидрильных групп. В некоторых вариантах осуществления, первая связывающая группа или вторая связывающая группа выбрана из группы, состоящей из свободных аминов (-NH₂), свободных сульфгидрильных групп (-SH), свободных гидроксидных групп (-OH), карбоксилатов, гидразилов и алкоксиаминов. В некоторых вариантах осуществления, первая связывающая группа представляет собой функциональную группу, реакционноспособную по отношению к сульфгидрильным группам, такую как малеимид, пиридилдисульфид или галогенацетил. В некоторых вариантах осуществления, первая связывающая группа представляет собой малеимид.

В некоторых вариантах осуществления, вторая связывающая группа представляет

собой сульфгидрильную группу. Сульфгидрильная группа может быть установлена в таргетирующем домене с использованием любого способа, известного специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, сульфгидрильная группа присутствует в свободном цистеиновом остатке. В некоторых вариантах осуществления, сульфгидрильная группа выявляется посредством восстановления дисульфида в таргетирующем домене, например, посредством реакции с 2-меркаптоэтиламином. В некоторых вариантах осуществления, сульфгидрильная группа устанавливается посредством химической реакции, такой как реакция между свободным амином и 2-иминотиланом или N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA).

В некоторых вариантах осуществления, липид, конъюгированный с полимером, и таргетирующий домен функционализованы группами, используемыми в «клик» химии. Биоортогональная «клик» химия включает реакцию между функциональной группой с 1,3-диполем, такой как азид, нитрилоксид, нитрон, изоцианид и связь, и алкеновыми или алкиновыми диполярфилами. Типовые диполярфилы включают любые напряженные циклоалкены и циклоалкины, известные специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, циклооктины, дибензоциклооктины, монофторированные циклооктины, дифторированные циклооктины и биарилазациклооктинон.

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен конъюгируют с LNP с использованием малеимидной конъюгации.

Таргетирующий домен

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит таргетирующий домен, который направляет средство доставки к иммунной клетке-мишени. Таргетирующий домен может содержать нуклеиновую кислоту, пептид, антитело, малую молекулу, органическую молекулу, неорганическую молекулу, гликан, сахар, гормон и подобные, которые таргетируют частицу на сайт, который особенно нуждается в терапевтическом агенте. В некоторых вариантах осуществления, частица включает мультивалентное таргетирование, где частица содержит несколько механизмов таргетирования, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, домен, таргетирующий средство доставки, специфически связывается с мишенью, ассоциированной с сайтом, нуждающимся в агенте, содержащемся в средстве доставки. Например, таргетирующий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным болезненным состоянием. Такой мишенью может быть белок, фрагмент белка, антиген или другая биомолекула, связанная с сайтом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен представляет собой аффинный лиганд, который специфически связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления, мишень (например, антиген) ассоциирована с сайтом, нуждающимся в лечении агентом. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен может быть сополимеризован с композицией, содержащей средство доставки. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен может быть ковалентно присоединен к

композиции, содержащей средство доставки, например, посредством химической реакции между таргетирующим доменом и композицией, содержащей средство доставки. В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен представляет собой добавку к средству доставки. Таргетирующие домены настоящего изобретения включают, но не ограничены ими, антитела, фрагменты антител, белки, пептиды и нуклеиновые кислоты.

В различных вариантах осуществления, таргетирующий домен связывается с молекулой клеточной поверхности представляющей интерес клетки. Например, в различных вариантах осуществления, таргетирующий домен связывается с молекулой клеточной поверхности эндотелиальной клетки, стволовой клетки или иммунной клетки.

Пептиды

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен по настоящему изобретению содержит пептид. В некоторых вариантах осуществления, домен, таргетирующий пептид, специфически связывается с представляющей интерес мишенью.

Пептид настоящего изобретения можно получить химическими способами. Например, пептиды можно синтезировать твердофазными методами (Roberge J Y et al (1995) Science 269: 202-204), отщеплять от смолы и очищать препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией. Автоматизированный синтез может быть осуществлен, например, с использованием пептидного синтезатора ABI 431 A (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями производителя.

Альтернативно пептид можно получить рекомбинантным способом или путем отщепления от более длинного полипептида. Композицию пептида можно подтвердить аминокислотным анализом или секвенированием.

Варианты пептидов по настоящему изобретению могут быть (i) такими, в которых один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативным или не консервативным аминокислотным остатком (предпочтительно, консервативным аминокислотным остатком), и такой замещенный аминокислотный остаток может быть или не быть кодируемым генетическим кодом, (ii) такими, в которых имеется один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, например, остатков, которые модифицированы путем присоединения замещающих групп, (iii) такими, в которых пептид представляет собой альтернативный вариант сплайсинга пептида по настоящему изобретению, (iv) фрагментами пептидов и/или (v) такими, в которых пептид слит с другим пептидом, таким как лидерная или секреторная последовательность или последовательность, которая используется для очистки (например, His-метка) или для обнаружения (например, Sv5 эпитопная метка). Фрагменты включают пептиды, полученные посредством протеолитического расщепления (включая многосайтовый протеолиз) исходной последовательности. Варианты могут быть пост-трансляционными или химически модифицированными. Считается, что такие варианты находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники, исходя из представленных в настоящем документе идей.

Как известно в данной области техники, «сходство» между двумя пептидами

определяется путем сравнения аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных замен одного пептида с последовательностью второго пептида. Варианты определяются как включающие пептидные последовательности, отличающиеся от исходной последовательности, предпочтительно, отличающиеся от исходной последовательности менее чем на 40% остатков на представляющий интерес сегмент, более предпочтительно, отличающиеся от исходной последовательности менее чем на 25% остатков на представляющий интерес сегмент, более предпочтительно, отличающиеся от исходной белковой последовательности всего на несколько остатков на представляющий интерес сегмент, и в то же время достаточно гомологичные исходной последовательности, чтобы сохранить функциональность исходной последовательности. Настоящее изобретение включает аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90% или 95% сходны или идентичны исходной аминокислотной последовательности. Степень идентичности между двумя пептидами определяют с использованием компьютерных алгоритмов и способов, которые широко известны специалистам в данной области техники. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями предпочтительно, определяют с использованием алгоритма BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI/NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Пептиды по изобретению могут быть пост-трансляционно модифицированы. Например, пост-трансляционные модификации, подпадающие под объем настоящего изобретения, включают расщепление сигнального пептида, гликозилирование, ацетилирование, изопренилирование, протеолиз, миристоилирование, сворачивание белка и протеолитический процессинг и т.д. Некоторые модификации или события процессинга требуют введения дополнительных биологических механизмов. Например, события процессинга, такие как расщепление сигнального пептида и гликозилирование ядра, исследуют путем добавления микросомальных мембран собак или экстрактов яиц *Xenopus* (патент США № 6,103,489) к стандартной реакции трансляции.

Пептиды по изобретению могут включать аминокислоты неприродного происхождения, образованные пост-трансляционной модификацией или введением аминокислот неприродного происхождения во время трансляции.

Нуклеиновые кислоты

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен по изобретению содержит выделенную нуклеиновую кислоту, включая, например, ДНК олигонуклеотид и РНК олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, домен, таргетирующий нуклеиновую кислоту, специфически связывается с представляющей интерес мишенью. Например, в некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая специфически связывается с представляющей интерес мишенью.

Нуклеотидные последовательности домена, таргетирующего нуклеиновую кислоту, альтернативно могут содержать вариации последовательности по отношению к исходным нуклеотидным последовательностям, например, замены, вставки и/или делеции одного или нескольких нуклеотидов, при условии, что полученная нуклеиновая кислота функционирует как исходная и специфически связывается с представляющей интерес мишенью.

В том смысле, который используется в настоящем описании, нуклеотидная последовательность является «по существу гомологичной» любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, когда ее нуклеотидная последовательность имеет степень идентичности по отношению к нуклеотидной последовательности по меньшей мере 60%, преимущественно, по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 85%, и более предпочтительно, по меньшей мере 95%. Другие примеры возможных модификаций включают вставку одного или нескольких нуклеотидов в последовательность, добавление одного или нескольких нуклеотидов на любом из концов последовательности или делецию одного или нескольких нуклеотидов на любом конце или внутри последовательности. Степень идентичности между двумя полинуклеотидами определяют с использованием компьютерных алгоритмов и способов, которые широко известны специалистам в данной области техники. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями, предпочтительно, определяют с использованием алгоритма BLASTN [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI/NCIM Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Антитела

В некоторых вариантах осуществления, таргетирующий домен по настоящему изобретению содержит антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления, домен, таргетирующий антитело, специфически связывается с представляющей интерес мишенью. Такие антитела включают поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fab и их одноцепочечные Fv фрагменты (scFv), биспецифические антитела, гетероконъюгаты, человеческие и гуманизированные антитела.

Антитела могут представлять собой интактные моноклональные или поликлональные антитела, и иммунологически активные фрагменты (например, Fab или (Fab)₂ фрагмент), тяжелую цепь антитела, легкую цепь антитела, гуманизированные антитела, генетически сконструированную одноцепочечную молекулу Fv (Ladner et al, патент США № 4,946,778) или химерное антитело, например, антитело, которое обладает специфичностью связывания антитела мыши, но остальные части которого имеют человеческое происхождение. Антитела, включая моноклональные и поликлональные антитела, их фрагменты и химеры, можно получить с использованием способов, известных специалистам в данной области техники.

Такие антитела можно получать различными способами, включая культуры гибридом, рекомбинантную экспрессию в бактериях или культурах клеток млекопитающих и рекомбинантную экспрессию у трансгенных животных. Выбор методологии

производства зависит от нескольких факторов, включая желаемую структуру антитела, важность углеводных фрагментов антител, простоту культивирования и очистки и стоимость. Множество различных структур антител могут быть созданы с использованием стандартной технологии экспрессии, включая полноразмерные антитела, фрагменты антител, такие как фрагменты Fab и Fv, а также химерные антитела, содержащие компоненты разных видов. Фрагменты антител малого размера, такие как фрагменты Fab и Fv, не обладающие эффекторными функциями и имеющие ограниченную фармакокинетическую активность, могут быть получены в бактериальной системе экспрессии. Одноцепочечные фрагменты Fv демонстрируют низкую иммуногенность.

Антигены

Настоящее изобретение предлагает композицию, которая индуцирует иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит LNP, таргетирующую иммунные клетки, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор CAR, специфичный в отношении антигена.

В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит полипептид или пептид, связанный с патогеном или опухолевой клеткой, так что модифицированная *in vivo* иммунная клетка, экспрессирующая CAR, затем таргетирует антиген, индуцируя иммунный ответ против антигена и, следовательно, патогена или опухолевой клетки.

В некоторых вариантах осуществления, антиген, распознаваемый CAR, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, содержит белок, пептид, его фрагмент или его вариант, или их комбинацию из любого количества организмов, например, вируса, паразита, бактерии, гриба или млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит опухолеспецифический антиген или опухолеассоциированный антиген, так что иммунная клетка, экспрессирующая CAR, направляется на опухолевую клетку, экспрессирующую антиген.

Вирусные антигены

В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит вирусный антиген, или его фрагмент, или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген происходит от вируса одного из следующих семейств: Adenoviridae, Arenaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Hepadnaviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Papovaviridae, Paramyxoviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae, Reoviridae, Retroviridae, Rhabdoviridae или Togaviridae. В некоторых вариантах осуществления, вирусный антиген происходит из вирусов папилломы, например, вируса папилломы человека (HPV), вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса полиомиелита, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса натуральной оспы (большой и малой оспы), вируса коровьей оспы, вируса гриппа, риновирусов, вируса лихорадки денге, вирусов лошадиного энцефалита, вируса краснухи, вируса желтой лихорадки, вируса Норуолка, вируса гепатита А, вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-I), вируса волосатоклеточного лейкоза (HTLV-II), вируса калифорнийского энцефалита, вируса Ханта (геморрагической лихорадки), вируса бешенства, вируса лихорадки Эбола, вируса

Марбург, вируса кори, вируса паротита, респираторно-синцитиального вируса (RSV), простого герпеса 1 (орального герпеса), простого герпеса 2 (генитального герпеса), опоясывающего герпеса (варицелла-зостер, он же ветряная оспа), цитомегаловируса (CMV), например CMV человека, вируса Эпштейн-Барр (EBV), флавивируса, вируса ящура, вируса чикунгунья, вируса Ласса, аренавируса, вируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) или вируса, вызывающего рак.

Паразитарные антигены

В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит паразитарный антиген или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления, паразит представляет собой простейших, гельминтов или эктопаразитов. В некоторых вариантах осуществления, гельминт (т.е. червь) представляет собой плоского червя (например, сосальщиков и ленточных червей), колючего червя или круглого червя (например, остриц). В некоторых вариантах осуществления, эктопаразитом являются вши, блохи, иксодовые клещи и клещи.

В некоторых вариантах осуществления, паразит представляет собой любого паразита, вызывающего следующие заболевания: акантамебный кератит, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, балантидиаз, байлисаскаридоз, болезнь Чагаса, клонорхоз, кохлиомию, криптоспориديоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, слоновую болезнь, энтеробиоз, фасциолез, фасциолопсидоз, филяриоз, лямблиоз, гнатостомоз, гименолепидоз, изоспороз, лихорадку Катаяма, лейшманиоз, болезнь Лайма, малярию, метагонимоз, миаз, онхоцеркоз, педикулез, чесотку, шистосомоз, сонную болезнь, стронгилоидоз, тениоз, токсокароз, токсоплазмоз, трихинеллез и трихуриоз.

В некоторых вариантах осуществления, паразит представляет собой акантамебу, антисакиса, аскариду, овода, балантидия, клопа, цестоду (ленточного червя), песчаных блох, *Cochliomyia hominivorax*, дизентерийную амёбу, фасциолу обыкновенную, лямблию кишечную, анкилостому, лейшманию, *Linguatula serrata*, печеночного сосальщика, *Loa loa*, легочного сосальщика *Paragonimus*, острицу, *Plasmodium falciparum*, шистостому, кишечную угрицу, клеща, солитера, токсоплазму гонди, трипаносому, власоглава или *Wuchereria Bancrofti*.

Бактериальные антигены

В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит бактериальный антиген или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления, бактерия принадлежит к любому из следующих типов: Acidobacteria, Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Caldiseptica, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Chrysiogenetes, Cyanobacteria, Deferribacteres, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Thermodesulfobacteria, Thermotogae и Verrucomicrobia.

В некоторых вариантах осуществления, бактерия представляет собой

грамположительную бактерию или грамотрицательную бактерию. В некоторых вариантах осуществления, бактерия представляет собой аэробную бактерию или анаэробную бактерию. В некоторых вариантах осуществления, бактерия представляет собой автотрофную бактерию или гетеротрофную бактерию. В некоторых вариантах осуществления, бактерия является мезофилом, нейтрофилом, экстремофилом, ацидофилом, алкафилом, термофилом, психрофилом, галофилом или осмофилом.

В некоторых вариантах осуществления, бактерия представляет собой бактерию сибирской язвы, бактерию, резистентную к антибиотикам, бактерию, вызывающую заболевание, бактерию пищевого отравления, инфекционную бактерию, бактерию сальмонеллы, бактерию стафилококка, бактерию стрептококка или бактерию столбняка. В некоторых вариантах осуществления, бактерия представляет собой микобактерию, *Clostridium tetani*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) или *Clostridium difficile*.

Грибковые антигены

В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит грибковый антиген или его фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления, гриб представляет собой виды *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, дрожжи *Candida* (например, *Candida albicans*), *Coccidioides*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, дерматофит, виды *Fusarium*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucoromycotina*, *Pneumocystis jirovecii*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum* или *Cladosporium*.

Опухолевые антигены

В некоторых вариантах осуществления, антиген содержит опухолевый антиген, включая, например, опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген. В контексте настоящего изобретения, «опухолевый антиген», или «антиген гиперпролиферативного нарушения», или «антиген, ассоциированный с гиперпролиферативным нарушением», относятся к антигенам, которые являются общими для конкретных гиперпролиферативных заболеваний. В некоторых аспектах, антигены гиперпролиферативного нарушения по настоящему изобретению происходят из раков, включая, но не ограничиваясь ими, первичную или метастатическую меланому, мезотелиому, тимому, лимфому, саркому, рак легких, рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лейкозы, рак матки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки и аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы и подобные.

Опухолевые антигены представляют собой белки, которые продуцируются опухолевыми клетками и вызывают иммунный ответ, в частности, иммунный ответ, опосредованный Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, опухолевый антиген по настоящему изобретению содержит один или несколько антигенных раковых эпитопов, иммуногенно распознаваемых инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (ТIL), полученными из раковой опухоли млекопитающего. Выбор антигена будет зависеть от конкретного типа рака, который необходимо лечить или предупредить с помощью

композиции по изобретению.

Опухолевые антигены хорошо известны в данной области техники и включают, например, глиома-ассоциированный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA), β -хорионический гонадотропин человека, альфафетопротеин (AFP), лектин-реактивный AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN- CA IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, простатспецифический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простеин, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломеразу, опухолевый антиген-1 карциномы предстательной железы (PCTA-1), MAGE, ELF2M, эластазу нейтрофилов, эфринB2, CD22, фактор роста инсулина (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

В некоторых вариантах осуществления, опухолевый антиген содержит один или несколько антигенных раковых эпителиев, ассоциированных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут служить антигенами-мишенями для иммунной атаки. Эти молекулы включают, но не ограничены ими, тканеспецифические антигены, такие как MART-1, тирозиназа и GP 100 при меланоме, и кислую фосфатазу предстательной железы (PAP) и простатспецифический антиген (PSA) при раке предстательной железы. Другие молекулы-мишени относятся к группе молекул, связанных с трансформацией, таких как онкоген HER-2/Neu/ErbB-2. Еще одной группой антигенов-мишеней являются онкофетальные антигены, такие как карциноэмбриональный антиген (CEA). При В-клеточной лимфоме, опухолеспецифический идиотипный иммуноглобулин составляет истинно опухолеспецифический иммуноглобулиновый антиген, уникальный для отдельной опухоли. Антигены дифференциации В-клеток, такие как CD19, CD20 и CD37, являются другими кандидатами на роль антигенов-мишеней при В-клеточной лимфоме. Некоторые из этих антигенов (CEA, HER-2, CD19, CD20, идиотип) используют в качестве мишеней для пассивной иммунотерапии моноклональными антителами с ограниченным успехом.

Тип опухолевого антигена, упомянутый в изобретении, также может представлять собой опухолеспецифический антиген (TSA) или опухолеассоциированный антиген (TAA). TSA уникален для опухолевых клеток и не встречается в других клетках организма. TAA-ассоциированный антиген не является уникальным для опухолевой клетки и вместо этого также экспрессируется на нормальной клетке в условиях, которые не могут вызвать состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена на опухоли может происходить в условиях, которые позволяют иммунной системе отвечать на антиген. TAA могут представлять собой антигены, которые обычно присутствуют на очень низких уровнях в нормальных клетках, но экспрессируются на гораздо более высоких уровнях в опухолевых клетках.

Неограничивающие примеры TSA или TAA антигенов включают следующие: антигены дифференциации, такие как MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифические многолинейные антигены, такие как как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; сверхэкспрессированные

эмбриональные антигены, такие как CEA; сверхэкспрессированные онкогены и мутированные гены-супрессоры опухолей, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные опухолевые антигены, возникающие в результате хромосомных транслокаций; такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антигены вируса Эпштейн-Барр EBVA и антигены вируса папилломы человека (HPV) E6 и E7. Другие крупные антигены на основе белков включают TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-Катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротеин, бета-НСГ, ВСА225, ВТАА, СА 125, СА 15-3\СА 27.29\BCAA, СА 195, СА 242, СА-50, САМ43, CD68\Р1, СО-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, НТgp-175, М344, МА-50, МG7-Аg, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, ТА-90\Mac-2-связывающий белок\циклофилин С-ассоциированный белок, ТААL6, TAG72, TLP, и TPS.

Адьюванты

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит адьювант. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую адьювант. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая адьювант, представляет собой РНК IVT. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая адьювант, представляет собой нуклеозид-модифицированную иРНК.

Типовые адьюванты включают, но не ограничены ими, альфа-интерферон, гамма-интерферон, фактор роста тромбоцитов (PDGF), $TNF\alpha$, $TNF\beta$, GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), хемокин, привлекающий Т-клетки кожи (СТАСК), эпителиальный хемокин, экспрессируемый тимусом (ТЕССК), эпителиальный хемокин, ассоциированный со слизистой (МЕС), IL-12, IL-15, МНС, CD80, CD86, включая IL-15, имеющий удаленную сигнальную последовательность и необязательно включая сигнальный пептид из IgE. Другие гены, которые могут быть полезными адьювантами, включают гены, кодирующие: MCP-I, MIP-Ia, MIP-Ip, IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-I, VLA-I, Mac-1, pl50.95, PECAM, ICAM-I, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, рецептор TNF, Fit, Apo-1, p55, WSL-I, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Каспазу ICE, Fos, c-jun, Sp-I, Ap-I, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IкB, пассивный NIK, SAP K, SAP-I, JNK, гены ответа на интерферон, NFкB, Вах, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Oх40, Oх40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP 1, TAP2, анти-CTLA4-sc, анти-LAG3-Ig, анти-TIM3-Ig и их функциональные фрагменты.

Фармацевтические композиции

Составы фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, могут

быть приготовлены любым способом, известным или разработанным впоследствии в области фармакологии. В общем, такие способы получения включают стадию объединения активного ингредиента с носителем или одним или несколькими другими вспомогательными ингредиентами, и затем, если необходимо или желательно, формование или упаковку продукта в желаемую однократную или многократную форму.

Хотя описание фармацевтических композиций, представленное в настоящем документе, в основном относится к фармацевтическим композициям, которые подходят для этичного введения людям, специалисту в данной области техники будет понятно, что такие композиции обычно подходят для введения животным всех видов. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения людям, с целью сделать композиции пригодными для введения различным животным хорошо понятна, и ветеринарный фармаколог средней квалификации может разработать и осуществить такую модификацию с помощью простого эксперимента, если таковой вообще проводится. Субъекты, которым предполагается введение фармацевтических композиций по изобретению, включают, но не ограничены ими, людей и других приматов, млекопитающих, включая коммерчески важных млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки и собаки.

Фармацевтические композиции, которые можно использовать в способах по изобретению, могут быть приготовлены, упакованы или проданы в составах, подходящих для офтальмологического, перорального, ректального, вагинального, парентерального, местного, легочного, интраназального, буккального, внутривенного, интрацеребровентрикулярного, интрадермального, внутримышечного или другого пути введения. Другие рассматриваемые составы включают проецируемые наночастицы, липосомальные препараты, повторно запечатанные эритроциты, содержащие активный ингредиент, и составы на основе иммуногенов.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена, упакована или продана оптом в виде разовой стандартной дозы или в виде множества разовых доз. В настоящем документе «стандартная доза» представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которую следует вводить субъекту, или удобной части такой дозы, такой как, например, половина или одна треть такой дозы.

Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого носителя и любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции по изобретению будут варьироваться в зависимости от личности, размера и состояния субъекта, получающего лечение, а также в зависимости от пути, которым предполагают вводить композицию. Например, композиция может содержать от 0,1% до 100% (масс/масс) активного ингредиента.

В дополнение к активному ингредиенту, фармацевтическая композиция по изобретению может дополнительно содержать один или несколько дополнительных

фармацевтически активных агентов.

Составы фармацевтической композиции по настоящему изобретению с контролируемым или пролонгированным высвобождением могут быть изготовлены с использованием традиционной технологии.

Используемый в настоящем документе термин «парентеральное введение» фармацевтической композиции включает любой путь введения, характеризующийся физическим повреждением ткани субъекта и введением фармацевтической композиции через повреждение в ткани. Таким образом, парентеральное введение включает, но не ограничено этим, введение фармацевтической композиции путем инъекции композиции, путем нанесения композиции через хирургический разрез, путем нанесения композиции через проникающую в ткань нехирургическую рану и подобные. В частности, рассматривается, что парентеральное введение включает, но не ограничено этим, внутривенную, интравитреальную, подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интрадермальную, внутригрудинную инъекцию, внутриопухолевую, внутривенную, интрацеребровентрикулярную и почечную диалитическую инфузию.

Составы фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, содержат активный ингредиент в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъекционные составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме стандартной дозированной формы, такой как ампулы или мультидозовые контейнеры, содержащей консервант. Составы для парентерального введения включают, но не ограничены ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые составы с пролонгированным высвобождением или биоразлагаемые составы. Такие составы могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном варианте осуществления состава для парентерального введения, активный ингредиент предоставлен в сухой (т.е. порошковой или гранулированной) форме для разведения подходящим носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме стерильной водной или масляной суспензии или раствора для инъекций. Эта суспензия или раствор может быть приготовлен в соответствии с известным уровнем техники и может содержать, помимо активного ингредиента, дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты, описанные в настоящем документе. Такие стерильные составы для инъекций могут быть приготовлены с использованием нетоксичного парентерально приемлемого разбавителя или растворителя, такого как, например, вода или 1,3-бутандиол. Другие приемлемые разбавители и растворители включают, но не ограничены ими, раствор

Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды. Другие составы для парентерального введения, которые полезны, включают такие, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме, в липосомальном препарате или в качестве компонента биоразлагаемых полимерных систем. Композиции для замедленного высвобождения или имплантации могут содержать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы, такие как эмульсия, ионообменная смола, труднорастворимый полимер или труднорастворимая соль.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть приготовлена, упакована или продана в составе, подходящем для легочного введения через ротовую полость. Такая композиция может содержать сухие частицы, которые содержат активный ингредиент и имеют диаметр в диапазоне от примерно 0,5 до примерно 7 нанометров, и предпочтительно, от примерно 1 до примерно 6 нанометров. Такие композиции удобны в форме сухих порошков для введения с использованием устройства, содержащего резервуар для сухого порошка, в который может быть направлен поток пропеллента для диспергирования порошка, или с использованием самодвижущегося контейнера для дозирования растворителя/порошка, такого как устройство, содержащее активный ингредиент, растворенный или суспендированный в низкокипящем пропелленте в герметично закрытом контейнере. Предпочтительно, такие порошки содержат частицы, в которых по меньшей мере 98% массовых частиц имеют диаметр более 0,5 нанометров и по меньшей мере 95% массовых частиц имеют диаметр менее 7 нанометров. Более предпочтительно, по меньшей мере 95% частиц по массе имеют диаметр более 1 нанометра и по меньшей мере 90% частиц по количеству имеют диаметр менее 6 нанометров. Композиции сухих порошков, предпочтительно, включают твердый мелкодисперсный порошкообразный разбавитель, такой как сахар, и их удобно поставлять в стандартной дозированной форме.

Низкокипящие пропелленты обычно включают жидкие пропелленты, имеющие точку кипения ниже 65°F при атмосферном давлении. Обычно пропеллент может составлять от 50 до 99,9% (масс./масс.) композиции, и активный ингредиент может составлять от 0,1 до 20% (масс./масс.) композиции. Пропеллент может дополнительно содержать дополнительные ингредиенты, такие как жидкое неионное или твердое анионное поверхностно-активное вещество или твердый разбавитель (предпочтительно, имеющий размер частиц того же порядка, что и частицы, содержащие активный ингредиент).

Составы фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, содержат активный ингредиент в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъекционные составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в стандартной дозированной форме, например, в ампулах или мультидозовых контейнерах, содержащих консервант. Составы для

парентерального введения включают, но не ограничены ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые составы с пролонгированным высвобождением или биоразлагаемые составы. Такие составы могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном варианте осуществления состава для парентерального введения, активный ингредиент предоставляется в сухой (т.е. порошковой или гранулированной) форме для восстановления подходящим носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме стерильной водной или масляной суспензии или раствора для инъекций. Эта суспензия или раствор может быть приготовлен в соответствии с известным уровнем техники и может содержать, помимо активного ингредиента, дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты, описанные в настоящем документе. Такие стерильные составы для инъекций могут быть приготовлены с использованием нетоксичного парентерально приемлемого разбавителя или растворителя, такого как, например, вода или 1,3-бутандиол. Другие приемлемые разбавители и растворители включают, но не ограничены ими, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды. Другие полезные для парентерального введения составы включают такие, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме, в липосомальном препарате или в качестве компонента биоразлагаемой полимерной системы. Композиции для замедленного высвобождения или имплантации могут содержать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы, такие как эмульсия, ионообменная смола, труднорастворимый полимер или труднорастворимая соль.

Используемый в настоящем документе термин «дополнительные ингредиенты» включает, но не ограничен ими, одно или несколько из следующих: эксципиенты; поверхностно-активные агенты; диспергирующие агенты; инертные разбавители; гранулирующие и разрыхляющие агенты; связывающие агенты; смазывающие агенты; подсластители; ароматизаторы; красители; консерванты; физиологически разлагаемые композиции, такие как желатин; водные носители и растворители; масляные носители и растворители; суспендирующие агенты; диспергирующие или смачивающие агенты; эмульгаторы, смягчающие агенты; буферы; соли; загустители; наполнители; эмульгаторы; антиоксиданты; антибиотики; противогрибковые агенты; стабилизаторы; и фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы. Другие «дополнительные ингредиенты», которые могут быть включены в фармацевтические композиции по изобретению, известны в данной области техники и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (1985, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA), который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Способы

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ доставки по меньшей мере одной, выбранной из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты и терапевтического агента, в клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одной липидной наночастицы (LNP), которая необязательно составлена в виде композиции, такой как, но не ограниченной ими, фармацевтическая композиция.

В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один ионизируемый липид, где ионизируемый липид составляет от примерно 10 до примерно 50% моль LNP.

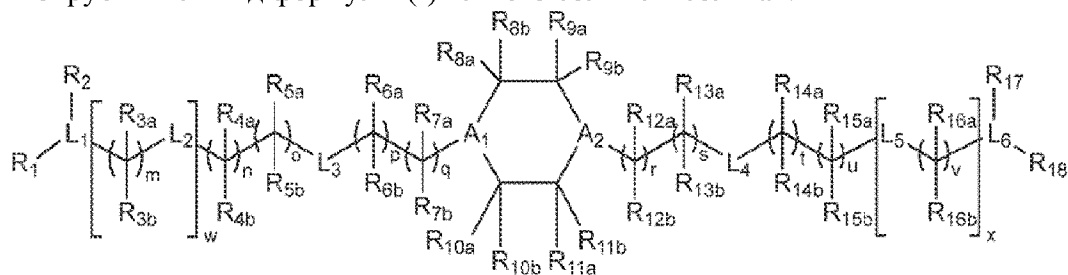
В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один хелперный липид, где хелперный липид составляет от примерно 10% моль до примерно 45% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из холестерина и заместителя холестерина, где комбинация холестерина и заместителя холестерина составляет от примерно 5% моль до примерно 50% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит по меньшей мере один полиэтиленгликоль (PEG) или PEG-конъюгированный липид, где PEG или PEG-конъюгированный липид составляет от примерно 0,5% моль до примерно 12,5% моль LNP.

В некоторых вариантах осуществления, LNP содержит домен, таргетирующий клетку, специфичный к связыванию с поверхностной молекулой клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления, домен, таргетирующий клетку, ковалентно конъюгирован по меньшей мере с одним компонентом LNP.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид представляет собой ионизируемый липид формулы (I) или его соль или сольват:



Формула (I),

в которой:

A_1 и A_2 независимо выбраны из группы, состоящей из CH, N и P;

L_1 и L_6 каждый независимо выбран из группы, состоящей из CR_{19} и N;

каждый случай L_2 и L_5 независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CHR_{19}-$, $-O-$, $-NH-$ и $-NR_{19}-$;

L_3 и L_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CHR_{19}-$, $-O-$, -

NH- и -NR₁₉-;

каждый случай R₁, R₂, R_{3a}, R_{3b}, R_{4a}, R_{4b}, R_{5a}, R_{5b}, R_{6a}, R_{6b}, R_{7a}, R_{7b}, R_{8a}, R_{8b}, R_{9a}, R_{9b}, R_{10a}, R_{10b}, R_{11a}, R_{11b}, R_{12a}, R_{12b}, R_{13a}, R_{13b}, R_{14a}, R_{14b}, R_{15a}, R_{15b}, R_{16a}, R_{16b}, R₁₇, R₁₈ и R₁₉ независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C₁-C₂₈ алкила, необязательно замещенного C₃-C₁₂ циклоалкила, -Y(R₂₀)_z·(R₂₁)_z· (необязательно замещенного C₃-C₁₂ циклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероциклоалкила, -Y(R₂₀)_z·(R₂₁)_z· (необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероциклоалкил), необязательно замещенного C₂-C₂₈ алкенила, необязательно замещенного C₅-C₁₂ циклоалкенила, -Y(R₂₀)_z·(R₂₁)_z· (необязательно замещенного C₅-C₁₂ циклоалкенила), необязательно замещенного C₂-C₂₈ алкинила, необязательно замещенного C₆-C₁₂ циклоалкинила, -Y(R₂₀)_z·(R₂₁)_z· (необязательно замещенного C₆-C₁₂ циклоалкинила), необязательно замещенного C₆-C₁₀ арила, -Y(R₂₀)_z·(R₂₁)_z· (необязательно замещенного C₆-C₁₀ арила), необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероарила, -Y(R₂₀)_z·(R₂₁)_z· (необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероарила), C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, линейного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, разветвленного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, C(=O)NH₂, NH₂, C₁-C₂₈ аминоалкила, C₂-C₂₈ аминоалкенила, C₂-C₂₈ аминоалкинила, C₆-C₁₀ аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C₁-C₂₈ гидроксиалкила, C₂-C₂₈ гидроксиалкенила, C₂-C₂₈ гидроксиалкинила, C₆-C₁₀ гидроксиарила, C₁-C₂₈ алкокси, карбоксила, карбоксилата, сложного эфира, -Y(R₂₀)_z·(R₂₁)_z·-эфира, -Y(R₂₀)_z·(R₂₁)_z·, -NO₂, -CN и сульфокси,

или два геминальных заместителя, выбранных из R_{3a} и R_{3b}, R_{4a} и R_{4b}, R_{5a} и R_{5b}, R_{6a} и R_{6b}, R_{7a} и R_{7b}, R_{8a} и R_{8b}, R_{9a} и R_{9b}, R_{10a} и R_{10b}, R_{11a} и R_{11b}, R_{12a} и R_{12b}, R_{13a} и R_{13b}, R_{14a} и R_{14b} или R_{15a} и R_{15b} могут быть объединены с атомом C, с которым они связаны, с образованием C=O;

каждый случай Y независимо выбран из группы, состоящей из C, N, O, S и P;

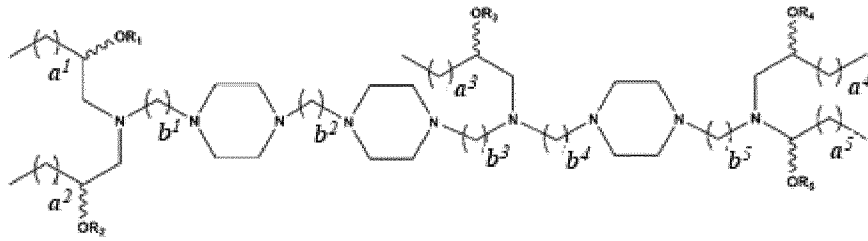
каждый случай R₂₀ и R₂₁ независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C₁-C₂₈ алкила, необязательно замещенного C₃-C₁₂ циклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероциклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероциклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₂₈ алкенила, необязательно замещенного C₅-C₁₂ циклоалкенила, необязательно замещенного C₂-C₂₈ алкинила, необязательно замещенного C₆-C₁₂ циклоалкинила, необязательно замещенного C₆-C₁₀ арила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероарила, C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, линейного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, разветвленного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, C(=O)NH₂, NH₂, C₁-C₂₈ аминоалкила, C₂-C₂₈ аминоалкенила, C₂-C₂₈ аминоалкинила, C₆-C₁₀ аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C₁-C₂₈ гидроксиалкила, C₂-C₂₈ гидроксиалкенила, C₂-C₂₈ гидроксиалкинила, C₆-C₁₀ гидроксиарила, C₁-C₂₈ алкокси, карбоксила, карбоксилата, сложного эфира, -NO₂, -CN и сульфокси,

или R₂₀ и R₂₁ могут быть объединены с атомом Y, с которым они связаны, с образованием C=O);

каждый случай z' и z'' независимо равен 0, 1 или 2; и

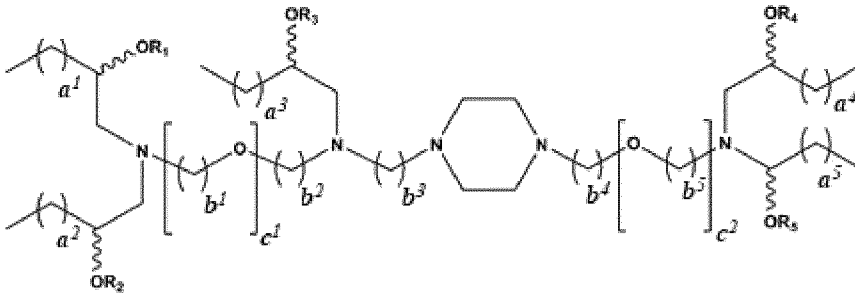
каждый случай m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w и x независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид Формулы (I) представляет собой:



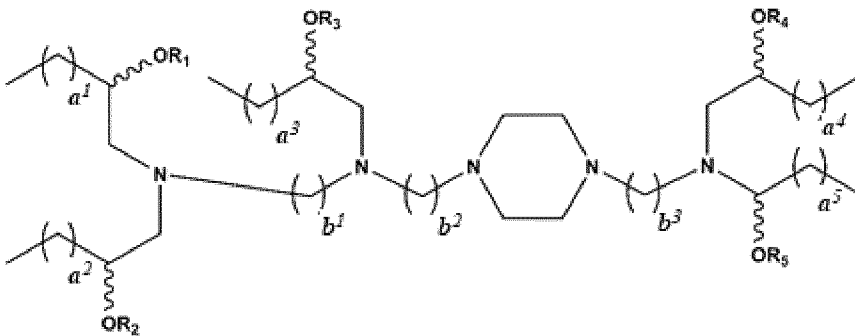
Формула (II).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид Формулы (I) представляет собой:



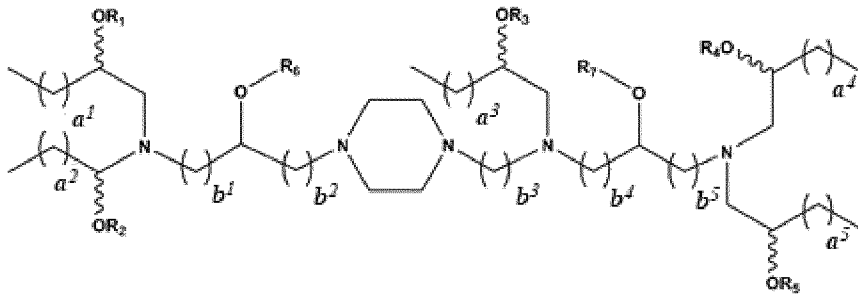
Формула (III).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид Формулы (I) представляет собой:



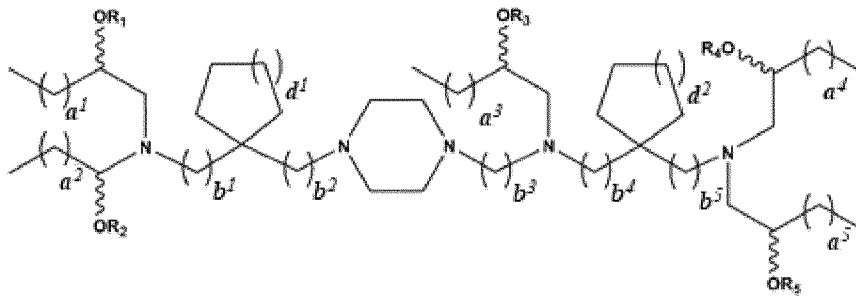
Формула (IV).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид Формулы (I) представляет собой:



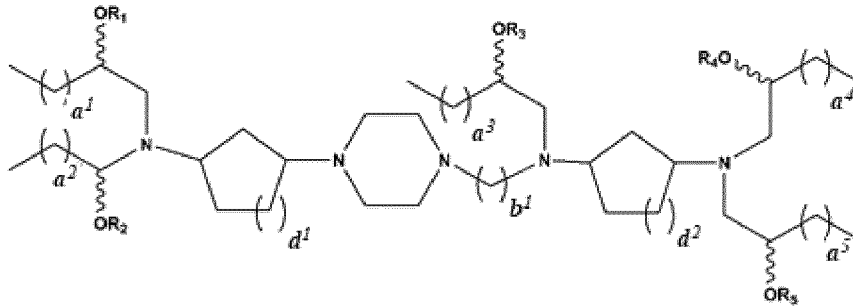
Формула (V).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид Формулы (I) представляет собой:



Формула (VI).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид Формулы (I) представляет собой:



Формула (VII).

В некоторых вариантах осуществления, к соединениям формулы (II), (III), (IV), (V), (VI) и (VII) независимо применяются следующие определения:

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 и R_7 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила, C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1 - C_{28} аминоалкила, C_2 - C_{28} аминоалкенила, C_2 - C_{28} аминоалкинила, C_6 - C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1 - C_{28} гидроксиалкила, C_2 - C_{28} гидроксиалкенила, C_2 - C_{28} гидроксиалкинила, C_6 - C_{10} гидроксиарила, C_1 - C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата и сложного эфира;

a^1 , a^2 , a^3 , a^4 и a^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

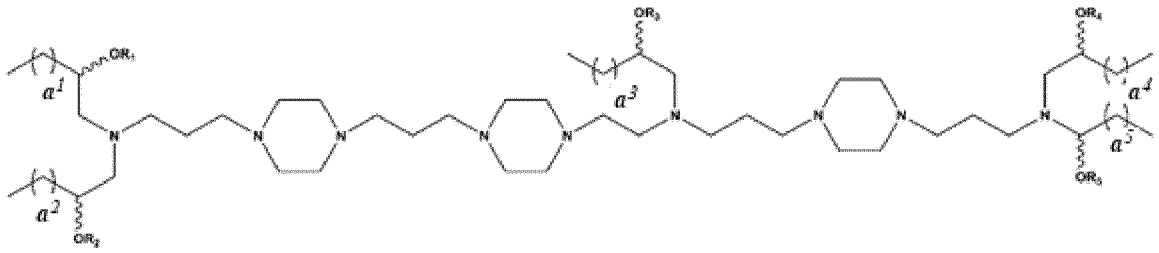
b^1 , b^2 , b^3 , b^4 и b^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

c^1 и c^2 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5; и

d^1 и d^2 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

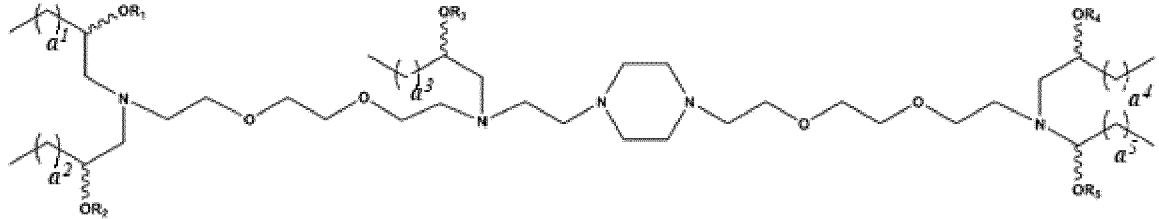
В некоторых вариантах осуществления, каждый из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 и R_7 независимо выбран из группы, состоящей из H, метила, этила, изопропила, *n*-пропила, *n*-бутила, *m*-бутила, *изо*-бутила и *втор*-бутила.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) представляет собой



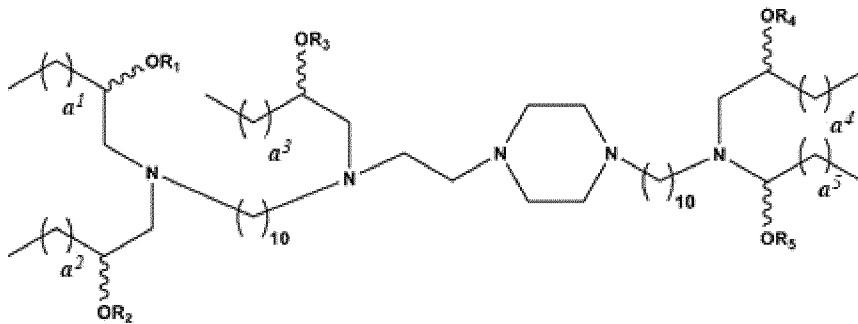
Формула (VIII).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) представляет собой



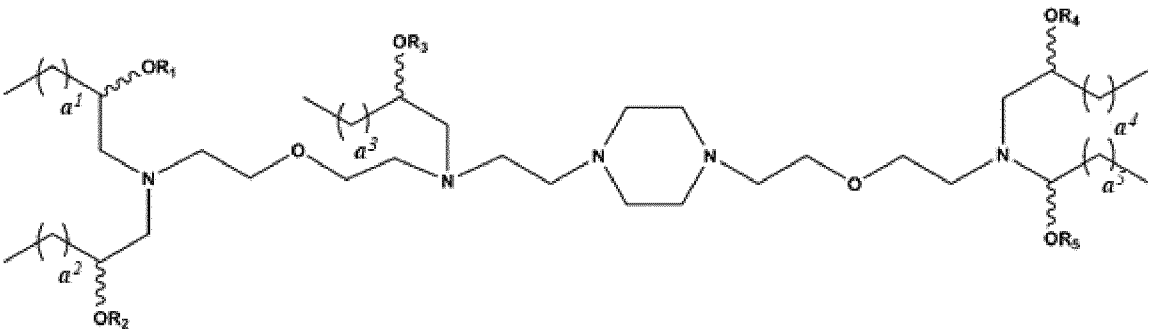
Формула (IX).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) представляет собой



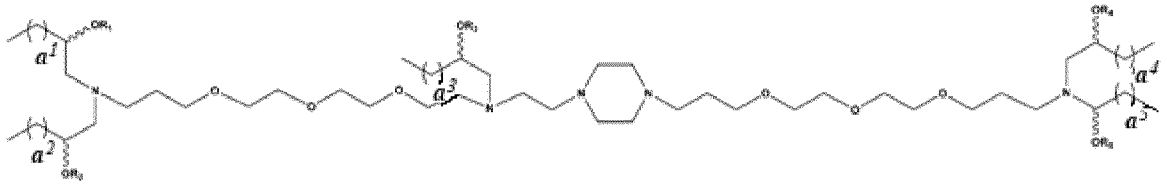
Формула (X).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) представляет собой



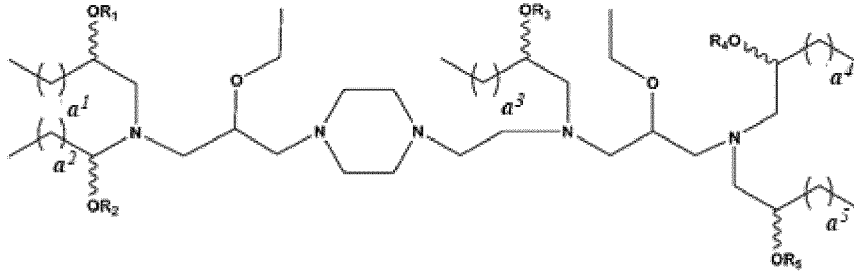
Формула (XI).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) представляет собой



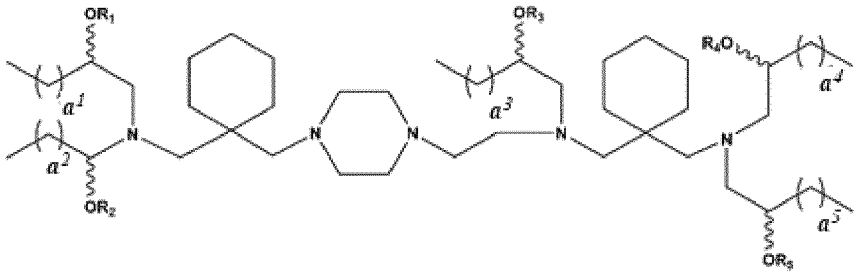
Формула (XII).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) представляет собой



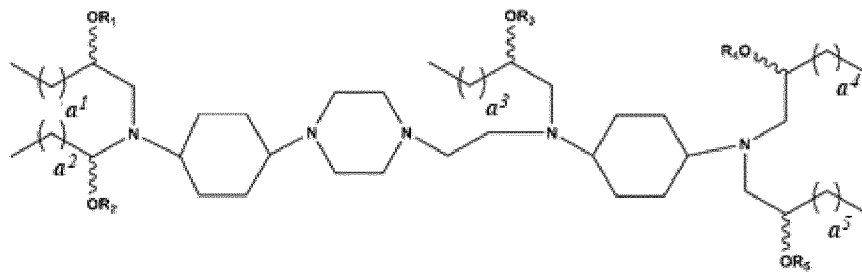
Формула (XIII).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) представляет собой



Формула (XIV).

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) представляет собой



Формула (XV).

В некоторых вариантах осуществления, к соединениям формулы (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV) и (XV) независимо применяются следующие определения:

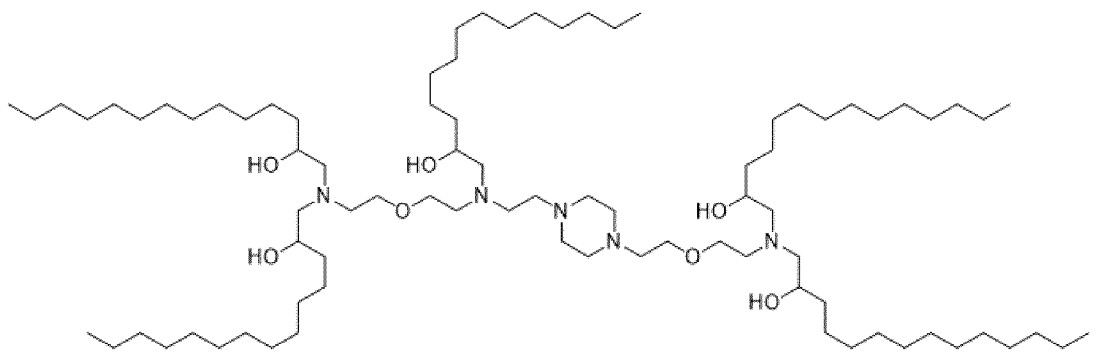
R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, необязательно замещенного C_2 -

C_{12} гетероарила, C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1 - C_{28} аминоалкила, C_2 - C_{28} аминоалкенила, C_2 - C_{28} аминоалкинила, C_6 - C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH , C_1 - C_{28} гидроксиалкила, C_2 - C_{28} гидроксиалкенила, C_2 - C_{28} гидроксиалкинила, C_6 - C_{10} гидроксиарила, C_1 - C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата и сложного эфира; и

a^1 , a^2 , a^3 , a^4 и a^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

В некоторых вариантах осуществления, каждый из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 независимо выбран из группы, состоящей из H , метила, этила, изопропила, *n*-пропила, *n*-бутила, *трет*-бутила, *изо*-бутила и *втор*-бутила.

В некоторых вариантах осуществления, ионизируемый липид формулы (I) содержит 1,1'-((2-(2-(4-(2-(2-(2-(бис(2-гидрокситетрадецил)амино)этокси)этил))(2-гидрокситетрадецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этокси)этил)азандиил)бис(тетрадекан-2-ол):



(C14-4).

Настоящее изобретение предлагает способы доставки агента в иммунную клетку субъекта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, агент представляет собой диагностический агент для обнаружения по меньшей мере одного маркера, связанного с заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления, агент представляет собой терапевтический агент для лечения или профилактики заболевания или нарушения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, изобретение предлагает способы диагностики, лечения или профилактики заболевания или нарушения, включающие введение эффективного количества композиции, содержащей один или несколько диагностических или терапевтических агентов, один или несколько адъювантов или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, способ обеспечивает доставку композиций для редактирования генов или генетических манипуляций к иммунной клетке-мишени субъекта для лечения или профилактики заболевания или нарушения. Типовые заболевания или нарушения включают, но не ограничены ими, патогенные заболевания и нарушения и рак.

В некоторых вариантах осуществления, способ обеспечивает иммунитет у субъекта-мишени к инфекции, заболеванию или нарушению, связанному с инфекционным агентом.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает способ лечения или профилактики инфекции, заболевания или нарушения, связанного с инфекционным агентом. Например, способ можно использовать для лечения или профилактики вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции или паразитарной инфекции, в зависимости от типа антигена вводимой композиции. Типовые антигены и связанные с ними инфекции, заболевания и опухоли описаны в других местах настоящего документа.

Настоящее изобретение также частично относится к способам лечения рака и связанных с ним заболеваний или нарушений у субъектов, нуждающихся в этом, где способ включает введение композиции, содержащей по меньшей мере одну LNP, таргетирующую иммунные клетки, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, специфичный для связывания с опухолевым антигеном для лечения рака или связанного с ним заболевания или нарушения. Типовые виды рака, которые можно лечить с использованием композиций и способов по изобретению, включают, но не ограничены ими, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, рак аппендикса, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, опухоли головного и спинного мозга, глиому ствола головного мозга, опухоль головного мозга, рак молочной железы, опухоли бронхов, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, лимфому центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, рак шейки матки, опухоль зрительных путей у детей, хордому, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, рак кожи, кожную Т-клеточную лимфому, рак эндометрия, эпендимобластому, эпендимому, рак пищевода, опухоли семейства Юинга, экстракраниальный рак, внегонадную герминогенную опухоль, внепеченочный рак желчных протоков, внепеченочный рак, рак глаза, фунгоиды, рак желчного пузыря, рак желудка (желудка), рак желудочно-кишечного тракта, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечную стромальную опухоль (gist), герминогенную опухоль, гестационный рак, гестационную трофобластическую опухоль, глиобластому, глиому, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак (печени), гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, рак гипоталамического отдела, глиому гипоталамического и зрительного пути, опухоль гипоталамуса, внутриглазной рак (глаза), внутриглазную меланому, опухоли островковых клеток, саркому Капоши, рак почки (почечно-клеточный), рак клеток Лангерганса, гистиоцитоз клеток Лангерганса, рак гортани, лейкоз, рак губ и полости рта, рак печени, рак легких, лимфому, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости и остеосаркому, медуллобластому, медуллоэпителиому, меланому, карциному Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным течением, рак полости

рта, синдром множественных эндокринных неоплазий, множественную миелому, микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, миелолейкоз, миелому, миелопролиферативные нарушения, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластома, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, рак рта, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, яичников, рак яичников, эпителиальный рак яичников, герминогенную опухоль яичников, опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом, рак поджелудочной железы, папилломатоз, параганглиому, рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, шишковидно-паренхиматозные опухоли промежуточной дифференциации, пинеобластома и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, плазмноклеточное новообразование, плазмноклеточное новообразование/множественную миелому, плеврорлегочную бластома, первичный рак центральной нервной системы, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак (почки), рак почечной лоханки и мочеточника, карциному дыхательных путей с участием гена *nut* на хромосоме 15, ретинобластома, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркому, синдром Сезари, рак кожи (меланому), рак кожи (не меланому), карциному кожи, мелкоклеточный рак легких, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак шеи, рак желудка (желудка), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластома, Т-клеточную лимфому, рак яичка, рак горла, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трофобластическую опухоль, рак уретры, рак матки, саркому матки, рак влагалища, глиому зрительных путей и гипоталамуса, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят субъекту-мишени, имеющему инфекцию, заболевание или рак. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят субъекту с риском развития инфекции, заболевания или рака. Например, композицию можно вводить субъекту, который подвержен риску контакта с вирусом, бактерией, грибом, паразитом или подобными.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение LNP, таргетирующей иммунные клетки, содержащей одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, для лечения или профилактики заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты кодируют терапевтический агент для лечения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты кодируют агент для таргетирования Т-клеток на антиген, экспрессируемый патогеном или раковой клеткой (например, молекула иРНК, кодирующая химерный антигенный рецептор).

В некоторых вариантах осуществления, композиции по изобретению можно вводить в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, адъювантом или их комбинацией. Например, в некоторых вариантах осуществления, способ включает введение LNP, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько агентов для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, и второй LNP, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или несколько адъювантов. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение одного LNP, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько агентов для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько адъювантов.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту множества нуклеозид-модифицированных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих множество агентов для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, адъювантов или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, способ по настоящему изобретению позволяет обеспечить устойчивую экспрессию агента для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, или адъюванта, описанного в настоящем документе, в течение по меньшей мере нескольких дней после введения. Однако в некоторых вариантах осуществления, способ также обеспечивает временную экспрессию, поскольку в некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота не интегрирована в геном субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение нуклеозид-модифицированной РНК, которая обеспечивает стабильную экспрессию агента для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, или адъюванта, описанного в настоящем документе.

Введение композиций по изобретению в способе лечения может быть достигнуто рядом различных способов с использованием способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, способ по изобретению включает системное введение субъекту, включая, например, энтеральное или парентеральное введение. В некоторых вариантах осуществления, способ включает интрадермальную доставку композиции. В некоторых вариантах осуществления, способ включает внутривенную доставку композиции. В некоторых вариантах осуществления, способ включает внутримышечную доставку композиции. В некоторых вариантах осуществления, способ включает подкожную доставку композиции. В некоторых вариантах осуществления, способ включает ингаляцию композиции. В некоторых вариантах осуществления, способ включает интраназальную доставку композиции.

Следует понимать, что композицию по изобретению можно вводить субъекту либо отдельно, либо в комбинации с другим агентом.

Таким образом, терапевтические и профилактические способы по изобретению

охватывают использование фармацевтических композиций, кодирующих агент для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, адъюванта или их комбинации, описанных в настоящем документе, для практического применения способов по изобретению. Фармацевтические композиции, полезные для применения изобретения, можно вводить в дозе от нг/кг/день до 100 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления, изобретение рассматривает введение дозы, которая приводит к концентрации соединения настоящего изобретения от 10 нМ до 10 мМ у млекопитающего.

Обычно дозы, которые можно вводить млекопитающему, предпочтительно, человеку, в способе по настоящему изобретению, находятся в диапазоне от 0,01 мкг до примерно 50 мг на килограмм массы тела млекопитающего, тогда как точная вводимая дозировка будет варьироваться в зависимости от любого из ряда факторов, включающих, но не ограниченных ими, тип млекопитающего и тип заболевания, подлежащего лечению, возраст млекопитающего и путь введения. Предпочтительно, дозировка соединения будет варьироваться от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мг на килограмм массы тела млекопитающего. Более предпочтительно, дозировка будет варьироваться от примерно 1 мкг до примерно 1 мг на килограмм массы тела млекопитающего.

Композицию можно вводить млекопитающему так часто, как несколько раз в день, или ее можно вводить реже, например, один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц или даже реже, например, один раз в несколько месяцев или даже раз в год или реже. Частота введения дозы будет очевидна специалисту в данной области техники и будет зависеть от любого из ряда факторов, таких как, но не ограниченных ими, тип и тяжесть заболевания, подлежащего лечению, тип и возраст млекопитающего и т. д.

В некоторых вариантах осуществления, введение иммуногенной композиции или вакцины по настоящему изобретению может быть осуществлено путем однократного введения или усилено путем многократного введения.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение включает способ, включающий введение одной или нескольких композиций, кодирующих один или несколько агентов для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, или описанных в настоящем документе адъювантов. В некоторых вариантах осуществления, способ имеет аддитивный эффект, где общий эффект от введения комбинации приблизительно равен сумме эффектов от введения каждого агента для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, или адъюванта. В других вариантах осуществления, способ обладает синергическим эффектом, где общий эффект от введения комбинации превышает сумму эффектов от введения каждого агента для таргетирования иммунной клетки на представляющий интерес патоген или опухолевую клетку, или адъюванта.

ПРИМЕРЫ

Различные варианты осуществления настоящей заявки можно лучше понять, обратившись к следующим примерам, которые предлагаются в качестве иллюстрации.

Объем настоящей заявки не ограничивается приведенными в настоящем документе примерами.

Материалы и способы

Материалы

DLin-MC3-DMA (MC3) приобретают у MedChemExpress. Дексаметазон получают от Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Другие хелперные липиды приобретают у Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Продуцирование иРНК люциферазы

Кодон-оптимизированную люциферазу светлячка клонируют в плазмиду, продуцирующую иРНК (оптимизированную 3' и 5' UTR и содержащую 101 полиА хвост), транскрибируемую *in vitro* в присутствии N¹-метилпсевдоурдин-модифицированного нуклеозида (Nmψ), котранскрипционно копируют с использованием технологии CleanCap™ (TriLink) и очищают целлюлозой для удаления дцРНК. Очищенную иРНК осаждают этанолом, промывают, ресуспендируют в воде, не содержащей нуклеазу, и подвергают контролю качества (*например*, электрофорезу, дот-блоттингу и трансфекции в дендритные клетки человека). иРНК хранят при -80°C до использования.

Составление и характеристика липидных наночастиц (LNP)

В некоторых вариантах осуществления, этанольную фазу, содержащую все липиды, и водную фазу, содержащую иРНК, смешивают с использованием микрофлюидного устройства для синтеза LNP. Этанольная фаза включает ионизируемый липид (MC3), 1,2-дистеариол-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DSPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (C14PEG-2000), холестерин и дексаметазон. MC3, DSPC и C14PEG-2000 объединяют в молярном соотношении 50%, 10% и 1,5%, соответственно. Молярные соотношения холестерина и дексаметазона варьируются в зависимости от состава и имеют общее молярное соотношение 38,5%. Водная фаза содержит иРНК люциферазы, растворенную в 10 mM цитратном буфере. Этаноловую и водную фазы смешивают со скоростью потока 1,8 мл/мин и 0,6 мл/мин (3:1), соответственно, с использованием шприцевых насосов Pump33DS (Harvard Apparatus, Holliston, MA). LNP помещают в 1X PBS для диализа в кассете для микродиализа (20000 MWCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) на 2 часа, и затем фильтруют через фильтр 0,22 мкм. Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, U.K.) используют для измерения индекса полидисперсности (PDI) и Z-среднего диаметра. Концентрацию иРНК и эффективность инкапсуляции в каждом составе LNP измеряют с помощью модифицированного анализа Quant-iT RiboGreen (ThermoFisher).

Липидные наночастицы (LNP) альтернативно синтезируют путем хаотического смешивания этанольной фазы и фазы лимонной кислоты в микрофлюидном устройстве в объемном соотношении 1:3 с использованием шприцевых насосов pump33DS (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Этанольная фаза содержит ионизируемый липид C14-4, 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DOPE) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]

(PEG) (Avanti Polar Lipids), холестерин (Avanti Polar Lipids) и X-гидроксихолестерин. Фаза лимонной кислоты содержит 10 мМ лимонной кислоты и иРНК люциферазы в концентрации 1 мг/мл. После синтеза, частицы впоследствии диализуют в 1x PBS в течение 2 часов и стерильно фильтруют через 0,22 мкм фильтры.

Дизайн библиотеки

В некоторых вариантах осуществления, скрининг библиотеки включает оценку 6 гидроксихолестеринов (*m.e.* холестерин с гидроксильными группами, добавленными к различным положениям холестерина): 7 α -гидроксихолестерина (Abcam, Cambridge, MA), 7 β -гидроксихолестерина (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 19-гидроксихолестерина (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI), 20 (S)-гидроксихолестерина (Abcam, Cambridge, MA), 24 (S)-гидроксихолестерина (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI), 25-гидроксихолестерина (Abcam, Cambridge, MA). Молярное процентное содержание эксципиента в составе основы библиотеки составляет 35% C14-494, 16% DOPE, 46,5% холестерина и 2,5% PEG. Шесть кандидатных гидроксихолестеринов включают в эти составы путем замены холестерина гидроксихолестерином с различными процентами молярного замещения (12,5%, 25%, 50%, 100%). Молярные проценты эксципиентов для этих кандидатных составов поддерживают на уровне 35% C14-494, 16% DOPE, 46,5% общего холестерина и 2,5% PEG, где общий холестерин представляет собой холестерин и заменитель гидроксихолестерина.

Характеризация LNP

В некоторых вариантах осуществления, концентрацию иРНК в образце LNP определяют с использованием поглощения A260 на планшетном ридере Infinite M Plex (Tecan, Morristown, NC). Z-средний диаметр (размер частиц) и индекс полидисперсности (PDI) определяют с использованием динамического рассеяния света (ДРС) на Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK). pKa рассчитывают с помощью анализов 6-(p-толуидино)-2-нафталинсульфоновой кислоты (TNS). Буферные растворы 150 мМ хлорида натрия, 20 мМ фосфата натрия, 25 мМ цитрата аммония и 20 мМ ацетата аммония доводят до значений pH с шагом 0,5 от 2 до 12. К каждому раствору с отрегулированным pH добавляют LNP в 96-луночной планшете, и затем в каждую лунку добавляют TNS до конечной концентрации TNS 6 мкМ. Полученную флуоресценцию считывают на планшетном ридере Infinite M Plex. Полученные данные аппроксимируют с помощью сигмоидальной регрессии и рассчитывают pKa как pH, при котором интенсивность флуоресценции достигает 50% от максимального значения. Эффективность инкапсуляции определяют с помощью набора Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя.

Культура клеток

Клетки линии гепатомы человека HepG2 и клетки линии макрофагов мыши RAW264.7 получают из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA). Их культивируют в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% антибиотиков (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и инкубируют при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Иммортализованные Т-клетки Jurkat (ATCC № TIB-152) культивируют в среде RPMI-1640 с L-глутамином (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 1% пенициллином-стрептомицином (P/S). Первичные Т-клетки человека (CD3+) собирают у здоровых доноров-добровольцев и получают из Центра иммунологии человека в Penn Medicine. Первичные Т-клетки человека затем объединяют в среде RPMI-1640 с L-глутамином, 10% FBS и 1% P/S при соотношении CD4+ и CD8+ Т-клеток 1:1. Первичные Т-клетки человека затем активируют с микроносителями Human T-activator CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fisher Scientific) в соотношении микроносителей к клеткам 1:1. Для всех скринингов, клетки высевают в 96-луночные планшеты по 60000 клеток на лунку в 60 мкл среды. Затем в лунки добавляют LNP в желаемой концентрации дозы иРНК (*например*, 60 нг на 60000 клеток). Клетки инкубируют в течение 24 часов перед проведением функционального анализа.

Трансфекция и цитотоксичность in vitro

Клетки HepG2 высевают в 96-луночный планшет с плотностью 1×10^4 клеток/лунку и дают расти в течение 24 часов. Для обработки клеток используют LNP с различным соотношением холестерина:дексаметазон (C:D) (10:0, 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10) в дозе 50 нг иРНК/лунку в течение 24 часов. После этого, экспрессию люциферазы и жизнеспособность клеток тестируют с использованием набора Luciferase Assay Kit (E4550, Promega) и набора CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit (G7572, Promega), соответственно.

Клетки RAW264.7 высевают в 12-луночный планшет с плотностью 2×10^5 клеток/лунку и дают расти в течение 24 часов. LNP используют для обработки клеток в дозе 500 нг иРНК/лунку в течение 24 часов. Супернатант собирают для анализа TNF- α .

Эксперименты на животных

Девять самок мышей C57BL/6 в возрасте 8-12 недель (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, ~20 г) случайным образом делят на три группы (n=3) и им внутривенно вводят PBS, оригинальную MC3 LNP (C10D0) или LNP с добавлением Dex (C9D1). Каждой мышши в группах, получающих LNP, инъецируют 4 мкг иРНК люциферазы. Через 20 часов у каждой мышши собирают кровь посредством ретроорбитального кровотечения и готовят сыворотку для анализа TNF- α . Биолюминесцентную визуализацию осуществляют с помощью системы IVIS Spectrum Imaging (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) через 20 часов после инъекции. D-люциферин (PerkinElmer, Waltham, MA) в дозе 150 мг/кг вводят мышам внутрибрюшинно (в/б) с последующей анестезией и визуализацией. Измеряют количество общего потока фотонов.

Измерение уровня цитокинов

Концентрацию TNF- α в культурах RAW264.7 и сыворотке мышей измеряют с использованием коммерчески доступного набора для анализа ELISA (Invitrogen).

Статистический анализ

Результаты анализируют с помощью непарного t-критерия Стьюдента и выражают в виде средних значений \pm СО или кратного увеличения с использованием пакета программного обеспечения Prism 5 (Graphpad, Inc., San Diego, CA). Статистическую

значимость определяется р-значением, равным или меньшим 0,05.

Анализ люциферазы и токсичности

Для определения экспрессии люциферазы, 96-луночные планшеты вращают при 300 g в течение 7 минут. Супернатант среды удаляют, и клетки ресуспендируют в 50 мкл 1x буфера для лизиса (Promega, Madison, WI) и 100 мкл субстрата для анализа люциферазы (Promega). После 10 минут инкубации, используют планшетный ридер для считывания люминесцентного сигнала из каждой лунки. Люминесценцию внутри каждого планшета нормализуют до S2. Для анализа токсичности, в каждую лунку добавляют 60 мкл CellTiter-Glo™ (Promega). После 10 минут инкубации, используют планшетный ридер для считывания люминесцентного сигнала из каждой лунки. Люминесценцию нормализуют внутри каждого планшета по отношению к необработанным клеткам.

Колокализация липидных наночастиц с кислыми органеллами

LNP разводят в 1x PBS до 10 нг иРНК люциферазы/мкл. Раствор для мечения клеток Vybrant™ DiO Cell-Labeling Solution (Thermo Fisher Scientific) добавляют к растворам LNP в объемном соотношении 1:75. Клетки Jurkat обрабатывают 60 нг иРНК люциферазы/60000 клеток в 60 мкл среды в течение 3 часов. Клетки собирают, центрифугируют при 300 g в течение 5 минут, ресуспендируют в среде RPMI, содержащей LysoTracker™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific) (1:3000) и инкубируют в течение еще 1 часа. Клетки собирают, центрифугируют при 300 g в течение 5 минут и ресуспендируют в 1x PBS. Затем содержащий клетки раствор PBS оставляют осесть в течение 15 минут на заключенном в камеру предметном стекле Nunc™ Lab-Тек™ II 4-well Chamber Slide со съёмными лунками (Thermo Fisher Scientific). PBS отсасывают, и предметные стекла инкубируют с 4% формальдегидом в течение 10 минут для фиксации клеток. Затем предметные стекла промывают 2 раза PBS по 5 минут каждый раз, осторожно покачивая. Наконец, стенки камеры удаляют, и на предметные стекла помещают покровные стекла для приготовления образцов для визуализации конфокальной микроскопией. Изображения получают с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 710 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Анализ эндосомальной направленной миграции

Jurkat обрабатывают либо 60, либо 150 нг иРНК люциферазы/60000 клеток в течение 4 часов. В каждой группе обработки используют не менее 750000 клеток. Клетки собирают, центрифугируют при 300 g в течение 5 минут и ресуспендируют в 1x PBS. Затем содержащий клетки раствор PBS оставляют осесть в течение 15 минут на заключенном в камеру предметном стекле с камерами Nunc™ Lab-Тек™ II 4-well Chamber Slide со съёмными лунками (Thermo Fisher Scientific). PBS отсасывают и предметные стекла инкубируют с 4% формальдегидом в течение 10 минут для фиксации клеток. Все последующие промывки и инкубации проводят при осторожном покачивании предметных стекол. Затем предметные стекла промывают 1x PBS в течение 5 минут и инкубируют с 0,3% Tween-20 в 1x PBS в течение 15 минут. Затем предметные стекла промывают 1x PBS, инкубируют/блокируют 2% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в 1x PBS в течение 30 минут. После стадии блокирования, предметные стекла инкубируют в течение 1 часа

либо с Rab5A #46449, Rab7 #9367, либо с Rab11 #5589 XP® Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) в соотношении 1:100. После 2 промывок в 1x PBS по 5 минут каждая, клетки покрывают и инкубируют с анти-кроличьим IgG (H+L), фрагментом F(ab')₂ (Alexa Fluor 647® Conjugate) № 4144 (Cell Signaling Technology) при 1:1000 в течение 1 часа. После 2 дополнительных промывок 1x PBS, готовят предметные стекла с использованием покровных стекол и гистологической среды ProLong™ Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific). Изображения получают с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 710 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Программное обеспечение для визуализации

Для расчетов колокализации, каналы накладывают друг на друга и colocal2, встроенный пакет колокализации Fiji. Коэффициент корреляции Спирмена записывают в общей сложности для 5 просмотров изображений (всего не менее 75 клеток).

Для общей количественной оценки экспрессии Rab5, Rab7 и Rab11 в анализах эндосомальной направленной миграции, представляющие интерес области выбирают вокруг клеток с использованием Fiji. Затем записывают интегральную плотность для каждой клетки (по меньшей мере всего 50 клеток в каждой группе обработки). Затем усредняют экспрессию Rab на клетку и записывают.

Пример 1: Рациональный дизайн типовых противовоспалительных липидных наночастиц для доставки иРНК

Кортикостероиды обладают противовоспалительным действием, и предыдущие исследования показали, что совместная доставка генов и противовоспалительных стероидов широкого спектра действия подавляет воспаление посредством ингибирования транскрипции провоспалительных генов. Дексаметазон (Dex) представляет собой широко используемый противовоспалительный кортикостероид. Было показано, что липидированный Dex уменьшает провоспалительные цитокины, подавляют иммунную активацию, запускаемую LNP, улучшают переносимость LNP и увеличивают экспрессию трансгена. Кроме того, недавно было продемонстрировано, что DLin-МС3-DMA (МС3) LNP, совместно доставляющие РНК терапевтические агенты и противовоспалительные стероиды (*например*, рофлепонид и будесонид), могут подавлять воспалительный ответ и увеличивать экспрессию белка в 1,2-1,9 раза по сравнению с исходным составом. Dex также имеет структурное сходство с холестерином, одним из компонентов LNP, ответственным за стабилизацию структуры LNP (ФИГ. 1А).

Описанные в настоящем документе эксперименты демонстрируют разработку противовоспалительного состава LNP, который совместно доставляет Dex и иРНК. Состав МС3, который одобрен FDA для доставки миРНК, изучается в настоящем исследовании для дальнейшей оптимизации, поскольку предыдущие исследования показали, что МС3 медленно деградирует и склонен вызывать иммунные ответы (Davies et al., 2021, Mol Ther Nucleic Acids, 24:369-384; Hou et al., 2021, Nat Rev Mater, 1-17; Hassett et al., 2019, Mol Ther Nucleic Acids, 15:1-11; Sabnis et al., 2018, Mol Ther, 26:1509-1519). Путем включения Dex непосредственно в структуру LNP, лекарственное средство можно доставить в те же клетки,

где LNP могут вызывать воспалительные ответы, и, следовательно, ожидается, что оно будет подавлять местное воспаление, вызванное LNP (ФИГ. 1B). С точки зрения трансляции, включение исходной формы Dex в LNP должно столкнуться с меньшими нормативными препятствиями и проблемами масштабирования, чем пролекарство Dex, конъюгированное с LNP, что приведет к возможности более широкого применения нового состава LNP. Представленные в настоящем документе данные демонстрируют, что LNP с добавлением Dex эффективно снижают продуцирование провоспалительных цитокинов как *in vitro*, так и *in vivo*, и увеличивают экспрессию иРНК в печени в 1,5 раза.

Пример 2: Характеризация типовых противовоспалительных LNP

LNP составляют путем смешивания водной фазы, содержащей иРНК, и органической фазы, содержащей МСЗ, 1,2-дистеариол-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPC), PEG-конъюгированный липид (C14PEG-2000), холестерин и дексаметазон в микрофлюидном устройстве (ФИГ. 2). Микрофлюидное устройство разработано для обеспечения возможности формирования LNP одинакового размера. Чтобы избежать иммунной активации иРНК, в ходе описанных в настоящем документе экспериментов используют очищенную иРНК, содержащую 1-метилпсевдоуридин.

Готовят МСЗ LNP без Dex (C10D0) и LNP с добавлением Dex (C9D1). Соглашение о наименованиях основано на относительном соотношении холестерин:дексаметазон (C:D). То есть состав, описанный как «C10D0», указывает, что относительное молярное соотношение C:D составляет 10:0, и молярное процентное содержание C:D в LNP C10D0 составляет 38,5%:0%. C9D1 LNP имеет молярное соотношение C:D 9:1, и молярное процентное соотношение C:D составляет 34,65%:3,8% (Таблица 1). Обе LNP имеют эффективность инкапсуляции >90% и находятся в нейтральном диапазоне ± 10 mV31. Более того, гидродинамические размеры, а также полидисперсность являются одинаковыми для обеих LNP (ФИГ. 3A-3B). Эти результаты позволяют предположить, что замена 10% холестерина на Dex оказывает минимальное влияние на размер и полидисперсность LNP, и что для последующих исследований разработаны LNP с добавлением Dex с высокой эффективностью инкапсуляции иРНК.

Таблица 1. Характеризация типовых противовоспалительных LNP

Свойство	C10D0	C9D1
Соотношение C:D	10:0	9:1
Молярное соотношение C:D в LNP (%)	38.50:0	34,65:3,85
Эффективность инкапсуляции (%)	92,52	93,46
Z-диаметр (нм)	71,37 \pm 0,017	76,84 \pm 1,25
Индекс полидисперсности (PDI)	0,150 \pm 0,017	0,124 \pm 0,046
Дзета-потенциал	-5,27 \pm 0,63	-0,12 \pm 0,10

Соотношение C:D представляет собой массовое соотношение холестерина и дексаметазона; \pm представляет CO.

Пример 3: Трансфекция *in vitro*, цитотоксичность и противовоспалительный

потенциал C9D1 LNP.

LNP, инкапсулирующие иРНК, кодирующую люциферазу, в присутствии или в отсутствие Dex, используют для обработки клеток HepG2 для оценки эффективности трансфекции и цитотоксичности. C9D1 LNP не демонстрирует снижение эффективности трансфекции по сравнению с C10D0 LNP (ФИГ. 4А). Более того, LNP C9D1 не демонстрирует повышенную цитотоксичность (ФИГ. 4В). Затем изучают возможность включения дополнительного Dex в LNP (Таблица 2). Хотя LNP все еще можно получить, эффективность трансфекции значительно снижается по мере увеличения доли Dex (ФИГ. 5А-5В). Эти результаты позволяют предположить, что замена части холестерина на Dex является ключом к поддержанию высокой эффективности трансфекции LNP.

Таблица 2. Характеризация типовых противовоспалительных LNP

Свойство	C10D0	C7D3	C5D5	C3D7	C0D10
Соотношение C:D	10:0	7:3	5:5	3:7	0:10
Молярное соотношение C:D в LNP (%)	38,50:0	26,95:11,5	19,25:19,25	11,55:26,9	0:38,50
Эффективность инкапсуляции (%)	92,52	95,59	93,52	95,70	69,21
Z-диаметр (нм)	71,37 ± 1,74	60,92 ± 2,89	81,13 ± 1,79	68,10 ± 1,82	76,69 ± 0,786
Индекс полидисперсности (PDI)	0,150 ± 0,017	0,033 ± 0,024	0,130 ± 0,037	0,139 ± 0,039	0,040 ± 0,018
Дзета-потенциал	-5,27 ± 0,63	-4,07 ± 0,29	-5,12 ± 0,52	-4,00 ± 0,77	-0,052 ± 0,132

Соотношение C:D представляет собой массовое соотношение холестерина и дексаметазона; ± представляет СО.

Чтобы проверить, может ли включение Dex подавлять иммунный ответ, запускаемый LNP, оценивают противовоспалительное действие C9D1 LNP на макрофаги мыши (RAW246.7) (ФИГ. 4С). После стимуляции клеток LNP в течение 24 часов, концентрацию TNF-α в супернатанте измеряют с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Хотя обработка C10D0 LNP значительно стимулирует продуцирование TNF-α приблизительно в 2,6 раза в клетках RAW246.7, обработка C9D1 LNP лишь незначительно повышает уровни TNF-α в 1,2 раза. Эти результаты показывают, что C9D1 LNP могут подавлять иммунный ответ *in vitro*, запускаемый LNP по настоящему изобретению.

Пример 4: Доставка иРНК *in vivo*, трансфекция и противовоспалительный эффект LNP C9D1

Мышей C57BL/6 используют для исследования воспалительного ответа и доставки

иРНК LNP по настоящему изобретению. LNP, содержащую 4 мкг иРНК, кодирующей люциферазу, вводят внутривенно (в/в) каждой мыши. Для группы лечения LNP C9D1, доза Dex составляет 0,62 мкг на мышью. Сыворотку нелеченных, LNP C10D0 и LNP C9D1 групп собирают для количественного определения TNF- α с помощью ELISA. Результаты показывают, что LNP, содержащая не модифицированный холестерин в качестве единственного соединения холестерина (*m.e.* не модифицированный холестерин и/или аналоги холестерина), вызывает воспалительную ответ, поскольку мыши, леченные C10D0 LNP, демонстрируют значительно более высокий уровень TNF- α , чем нелеченная контрольная группа. Напротив, концентрация TNF- α в сыворотке мышей, леченных C9D1 LNP, значительно снижена по сравнению с мышами, леченными C10D0 LNP (ФИГ. 6А). Эти результаты позволяют предположить, что C9D1 LNP может успешно снижать воспалительную реакцию, вызванную LNP, *in vivo*.

В предыдущих исследованиях используют более высокие дозы свободного Dex или пролекарства Dex для подавления воспалительного ответа, индуцированного LNP. Однако в описанных в настоящем документе экспериментах, не желая ограничиваться теорией, доставка более низкой дозы исходного Dex в C9D1 LNP в те же клетки, где LNP запускает воспалительный ответ, может быть использована для объяснения успешного подавления воспаления. То есть противовоспалительная LNP, которая подавляет местные иммунные ответы, может быть лучшим выбором по сравнению с подавлением системных иммунных ответов с помощью высоких доз свободного кортикостероида.

Затем исследуют *in vivo* трансфекцию иРНК, инкапсулированной в C9D1 LNP, кодирующей люциферазу. LNP MC3 представляет собой клинически проверенный невирусный вектор для трансфекции печени. Сильная экспрессия люциферазы в печени наблюдается как у мышей, леченных C9D1 LNP, так и у мышей, леченных C10D0 (ФИГ. 6В). Интересно, что количественная оценка сигнала люминесценции показывает 1,5-кратное увеличение у мышей, леченных C9D1 LNP, по сравнению с мышами, леченными C10D0 LNP. Этот результат согласуется с предыдущими сообщениями, которые предполагают, что подавление иммунного ответа, вызванного LNP, может увеличить экспрессию генов. Поскольку экспрессия трансгена может подавляться в присутствии воспалительных цитокинов, таких как TNF- α , C9D1 LNP может усиливать трансфекцию иРНК, ингибируя продуцирование воспалительных цитокинов. В совокупности, результаты показывают, что LNP C9D1 является многообещающим составом, который может одновременно уменьшать воспаление и усиливать экспрессию белков терапевтических агентов иРНК/LNP.

LNP (C9D1) с добавлением Dex успешно получена и демонстрирует сильные противовоспалительные эффекты. Обнаружено, что C9D1 LNP подавляет провоспалительный цитокин TNF- α до почти исходного уровня *in vitro*, и значительно снижает уровни TNF- α *in vivo* по сравнению с нативным C10D0 LNP. Из-за снижения воспалительных ответов, общая трансфекция иРНК улучшена в 1,5 раза у мышей, леченных C9D1 LNP. Таким образом, LNP с добавлением Dex представляет собой многообещающую

стратегию снижения побочных эффектов LNP, связанных с воспалением, при одновременном повышении экспрессии белков терапевтических агентов иРНК.

Пример 5: Замена гидроксистерина в ионизируемых липидных наночастицах для доставки иРНК в Т-клетки

Настоящее изобретение частично относится к LNP, содержащей класс аналогов холестерина (*m.e.* гидроксистерина). В одном аспекте, настоящее изобретение описывает оценку и/или влияние аналогов холестерина на LNP-опосредованную доставку иРНК в Т-клетки. Гидроксистерины выбраны в качестве представляющего интереса эксципиента, учитывая предыдущие исследования связывания фермент-лиганд, проведенные на NPC1 и различных аналогах холестерина. Добавление гидроксильной группы к различным положениям (*например*, полициклической основе и/или заместителю алкильной цепи 5-членного кольца полициклической основы) вдоль молекулы холестерина может изменить кинетику связывания между модифицированным холестерином и NPC1. Целью этого изменения является в конечном итоге снижение распознавания холестерина NPC1 во время эндосомальной направленной миграции LNP. Однако распознавание холестерина мембранными белками по-прежнему является критическим шагом для поглощения LNP. Таким образом, настоящее изобретение описывает оценку замены шести кандидатных гидроксистеринов с четырьмя различными процентами замещения, чтобы определить, улучшают ли какие-либо такие замещения доставку иРНК в Т-клетки.

Пример 6: Дизайн библиотеки типовых LNP, содержащих замещенный холестерин

Настоящее изобретение частично описывает дизайн, синтез и оценку доставки иРНК в Т-клетки с помощью типовых LNP настоящего изобретения. Базовый состав библиотеки (*m.e.* S2) представляет собой ранее оптимизированный состав со следующими эксципиентами и молярными процентными соотношениями: 35% ионизируемого липида C14-4, 46,5% холестерина, 16% DOPE и 2,5% липид-фиксированного PEG. Примечательно, что холестерин составляет значительный молярный процент состава LNP.

LNP может быть экзоцитозирована из клеток-мишеней посредством эндосомальной рециркуляции. Эти пути, в частности рециркуляция, опосредованная Ниманном Пиком типа C1 (NPC1), идентифицированы как основные факторы, способствующие снижению функциональной доставки грузов нуклеиновых кислот. Ферменты эндосомальной направленной миграции, такие как NPC1, распознают липиды, особенно холестерин, и рециркулируют эти липидные компоненты в клеточную мембрану. Исследования связывания фермента с лигандом показывают, что добавление гидроксильных групп к молекуле холестерина изменяет кинетику связывания между NPC1 и модифицированным холестерином. Эндосомальную направленную миграцию исследуют, чтобы охарактеризовать процессинг LNP на разных стадиях эндосомы. Направленную миграцию эндосом через клетку можно отслеживать с помощью семейства белков Ras-ассоциированного связывания (Rab). В частности, Rab5, Rab7 и Rab11 связываются с ранними, поздними и рециркулирующими эндосомами, соответственно (ФИГ. 7В).

Учитывая, что LNP обычно высвобождают груз иРНК в цитоплазму во время поздней эндосомы, очевидно, что LNP, которые могут достигать поздней эндосомы без последующей рециркуляции, имеют наибольшую склонность к функциональной доставке.

Описанная в настоящем документе конструкция библиотеки LNP включает замену класса аналогов холестерина (*m.e.* гидроксистероидов) в составе S2 с различными процентами замещения (ФИГ. 7C). Причиной замены гидроксистероидов в S2 является то, что такие модификации молекулы холестерина могут нарушить связывание между NPC1 и молекулами холестерина, тем самым уменьшая рециркуляцию LNP из клетки.

Оценивают шесть аналогов гидроксистероидов (*m.e.* 7 α -гидроксистероидин, 7 β -гидроксистероидин, 19-гидроксистероидин, 20(S)-гидроксистероидин, 24(S)-гидроксистероидин, 25-гидроксистероидин). Эти заменители холестерина выбраны на основе исследований связывания ферментов с лигандами, местоположения добавлений гидроксильных групп и коммерческой доступности. Многие из этих аналогов холестерина естественным образом обнаруживаются в организме и являются результатом процессинга холестерина активными формами кислорода и/или ферментами. Например, 7 α -гидроксистероидин является предшественником желчных кислот, и 20(S)-гидроксистероидин участвует в сигнальном пути онкопротеина Smoothed.

Каждый из заменителей гидроксистероидов обозначается сокращенно A1, A2, A3, B1, B2 и B3, соответственно. Заменители «А» (*m.e.* A1, A2 и A3) относятся к аналогам, которые имеют добавление гидроксильной группы к кольцевой структуре (*m.e.* полициклической основе) или телу молекулы холестерина. Заменители «В» (*m.e.* B1, B2 и B3) относятся к аналогам, которые имеют добавление гидроксильной группы на гидрофобном полюсе или хвосте молекулы холестерина (ФИГ. 8A). Каждый заменитель включен в состав S2 с процентом замещения 12,5%, 25%, 50% или 100%. Эта схема дизайна позволяет получить в общей сложности 24 LNP, которые названы по заменителю гидроксистероидов и процентному замещению. Например, состав A2-50 представляет собой 50% замену A2 в составе S2.

Важным фактором при введении новых эксципиентов в составы LNP является влияние этих добавок на стабильность частиц с течением времени. Во многом это связано с тем, что химические взаимодействия между липидными компонентами обеспечивают образование энергетически стабильных мембран. В частности, присутствие холестерина в липидных мембранах влияет на стабильность мембран и внутреннюю кривизну липидных бислоев, вызывая эффект упорядочения. Гидроксильная группа в голове молекулы холестерина служит гидрофильным полюсом и делает холестерин амфипатическим. Это позволяет холестерину ориентироваться вдоль нормали липидной мембраны и выравнивать соседние липиды. Кроме того, интеграция молекулы холестерина энергетически выгодна за счет неполярных взаимодействий между холестерином и липидами.

Хотя введение дополнительной гидроксильной группы в молекулу холестерина призвано препятствовать связыванию NPC1, такие модификации изменяют неполярные и электростатические взаимодействия холестерина с другими наполнителями LNP. В

частности, учитывая эффект упорядочения, который не модифицированный холестерин оказывает на образование и стабильность мембран, добавление такой гидрофильной группы к телу или хвосту молекулы холестерина может привести к нестабильности мембраны. Более того, добавление гидроксильной группы также может пространственно препятствовать выравниванию холестерина и соседних липидов. Следовательно, можно ожидать, что введение гидроксистероидов в составы LNP может снизить стабильность частиц.

Пример 7: Стабильность 100% замещений кандидатных гидроксистероидов в стандартном составе LNP

Параметры характеристики, оцениваемые в течение 28-дневного периода, включают z-средний диаметр, PDI, концентрацию иРНК и эффективность инкапсуляции (Таблица 3). Тенденции показывают, что 100% замена холестерина в составах LNP на определенные X-гидроксистероиды не оказывает отрицательного влияния на стабильность. Что касается диаметра частиц и PDI, большинство LNP со 100% замещением сохраняют размеры от 60 до 100 нм и PDI ниже 0,25 в течение 28-дневного периода. Временные тенденции концентрации иРНК и эффективности инкапсуляции с течением времени также являются сходными между всеми кандидатными LNP и S2 (ФИГ. 8B).

Таблица 3. Данные о характеристике библиотеки LNP для выбранных типовых холестерин-замещенных LNP

Частиц	Эффективность инкапсуляции (%)	Z-средний размер (нм)	Индекс полидисперсности (PDI)	Дзета-потенциал (мВ)	pKa
C2	91	90,6 ± 29,31	0,19 ± 0,07	-4,36 ± 3,73	5,9
A1-12.5	96	59,35 ± 7,43	0,2 ± 0,03	-6,9 ± 0,8	5,92
A2-12.5	96	84,88 ± 4,61	0,08 ± 0,07	-17,33 ± 2,46	5,79
A3-12.5	96	82,05 ± 2,34	0,17 ± 0,04	-5,75 ± 2,88	6,02
B1-12.5	95	61,03 ± 1,18	0,26 ± 0,02	-16,57 ± 2,48	5,97
B2-12.5	95	86,95 ± 3,91	0,07 ± 0,05	-8,48 ± 1,67	5,79
B3-12.5	95	77,52 ± 5,98	0,28 ± 0,02	-3,84 ± 1,21	6,17
A1-25	90	84,44 ± 16,88	0,19 ± 0,09	-8,82 ± 3,86	6,19
A2-25	91	78,52 ± 18,28	0,25 ± 0,04	-16,89 ± 10,8	6,03
A3-25	94	68,52 ± 1,79	0,22 ± 0,04	-10,75 ± 5,35	6,12
B1-25	95	95,1 ± 15,12	0,23 ± 0,03	-9,33 ± 1,07	5,91
B2-25	95	62,44 ± 2,66	0,25 ± 0,05	-10,18 ± 1,24	6,05
B3-25	94	75,39 ± 2,09	0,29 ± 0,03	-7,07 ± 0,25	6,08
A1-50	95	102,15 ±	0,23 ± 0,08	-2,36 ± 0,43	6,48

A2-50	95	115,68 ± 24,44	0,17 ± 0,12	-4,2 ± 0,36	6,16
A3-50	95	103,12 ± 7,73	0,18 ± 0,01	-9 ± 0,63	6,43
B1-50	96	97,6 ± 22,94	0,21 ± 0,03	-16,23 ± 1,08	6,12
B2-50	95	100,07 ± 6,55	0,36 ± 0,09	-9,68 ± 1,55	6,7
B3-50	95	138,7 ± 35,24	0,31 ± 0,07	-4,83 ± 0,88	6,2
A1-100	92	88,08 ± 10,05	0,22 ± 0,06	1,67 ± 1,13	6,44
A2-100	88	89,45 ± 13,88	0,19 ± 0,05	-2,46 ± 0,27	6,25
A3-100	91	81,79 ± 9,16	0,19 ± 0,07	-3,58 ± 3,7	5,73
B1-100	92	85,72 ± 6,89	0,17 ± 0,06	-4,55 ± 1,04	5,5
B2-100	92	137,02 ± 69,77	0,21 ± 0,09	-8,02 ± 0,16	5,68
B3-100	88	225,48 ± 157,36	0,3 ± 0,2	-14,9 ± 2,9	5,97

Однако следует отметить, что B2-100 и B3-100 демонстрируют некоторые нестабильные характеристики. Обе, B2-100 и B3-100, имеют средний диаметр более 100 нм и имеют тенденцию к снижению концентрации иРНК в образце. Кроме того, B3-100 имеет значительные изменения PDI в течение 28-дневного периода. B2-100 и B3-100 представляют собой 100% замещение холестерина на 24(S)-гидроксихолестерин и 25-гидроксихолестерин, соответственно, которые представляют собой хвостовые модификации молекулы холестерина. Высказано предположение, что добавление гидроксильной группы в хвостовой конец (*m.e.* алкильного заместителя 5-членного кольца полициклической основы холестерина) молекулы холестерина изменяет ее амфипатическую природу, потенциально препятствуя ее выравниванию внутри липидной мембраны, и в результате этого наблюдается нестабильность. Остальные четыре кандидатных гидроксистерина (*m.e.* A1, A2, A3 и B1), напротив, сопоставимы по всем параметрам во все дни с S2.

Учитывая, что составы со 100% замещением меняют стабильность с течением времени, составы, которые имеют 12,5%, 25% и 50% замещение холестерина на соответствующий кандидатный X-гидроксихолестерин, охарактеризованы в отношении, по крайней мере, рКа, зета-потенциала, z-среднего диаметра и PDI (ФИГ. 8С). рКа LNP предоставляет данные, указывающие эндоцитарный рН, при котором частица будет высвобождать груз в цитоплазму. Тенденции показывают, что для LNP, включающей замены гидроксистеринами с модифицированной основной, увеличение процента замещения связано с увеличением рКа, что позволяет предположить, что такие замещения могут играть роль в эндосомальном высвобождении. Измерения дзета-потенциала не имеют тенденции в определенном направлении. В то время как A1, A2, A3 (*m.e.* модификации основы) и B1 остаются в пределах ожидаемых диапазонов диаметра и PDI, B2 и B3 имеют

увеличенные диаметры частиц и являются более полидисперсными. Это еще раз подтверждает предыдущий вывод о том, что модификации хвоста на 24 или 25 конце молекулы холестерина нарушают нормальный синтез и образование LNP, возможно, за счет уменьшения эффекта упорядочения холестерина.

Пример 8: Скрининг *in vitro* типовых LNP настоящего изобретения

Хотя стабильность частиц является важным фактором при дизайне и оценке LNP, функциональная доставка также является важным показателем. Холестерин имеет решающее значение для слияния мембран, поэтому полное его удаление из составов LNP может привести к снижению эндосомального поглощения. Таким образом, библиотеку из 24 LNP, содержащих 6 заместителей гидроксистерина с 4 различными процентами замещения, оценивают в иммортализованных Т-клетках Jurkat с использованием экспрессии люциферазы и жизнеспособность клеток в качестве основных показателей.

Этот скрининг показывает, что в каждой категории заместителей гидроксистерина относительная экспрессия люциферазы по сравнению с S2 имеет тенденцию быть унимодальной с LNP с умеренной эффективностью, имеющей низкий и высокий процент замещения (*m. e.* 12,5% и 100%), и LNP с высокой эффективностью, имеющей умеренный процент замещения. (*m. e.* 25% и 50%) (ФИГ. 9А-9В). Скрининг также показал, что А1-25, А1-50 и В1-50 вызывают статистически значимые улучшения доставки иРНК к Jurkat по сравнению с S2 на 214%, 186% и 172%, соответственно. Более того, ни один из составов LNP в библиотеке не вызывает значительных изменений в жизнеспособности клеток, что позволяет предположить, что включение заместителей гидроксистерина в LNP не индуцирует повышенную гибель клеток. В конечном итоге А1-25, А1-50 и В1-50 демонстрируют повышенную доставку груза иРНК без существенного изменения токсичности частиц *in vitro*.

Пример 9: Скрининг *ex vivo* LNP, содержащих кандидатные гидроксистерины, в первичных Т-клетках человека

Для дальнейшего изучения переводимости этих модифицированных липидных наночастиц для применения *ex vivo*, проводят вторичный скрининг 12 LNP с LNPS, содержащими заместители А1, А2 и В1, в первичных Т-клетках человека. А1 и В1 выбраны потому, что А1-25, А1-50 и В1-50 показали лучшие результаты, чем S2 при оценке *in vitro*. Хотя ни один из кандидатных А2 существенно не улучшает доставку иРНК *in vitro*, А2-содержащие LNP также включены в эту оценку *ex vivo* из-за сходства А1 и А2 как стереоизомеров. Чтобы доставить иРНК к первичным Т-клеткам, Т-клетки должны быть активированы с помощью CD3/CD28-зависимых путей. Таким образом, эти триггеры размножения могут изменять мембранный гомеостаз клеток. Таким образом, все проценты замещения для трех выбранных заместителей гидроксистерина (*m. e.* А1, А2, В2) оценивают в настоящем анализе *ex vivo* для повторной оптимизации процентов замещения для применений *ex vivo*.

Несмотря на вариабельность от пациента к пациенту, скрининг показывает, что А1-25 и А1-50 значительно улучшают доставку иРНК к первичным Т-клеткам на 83% и 99%,

соответственно, по сравнению с S2 (ФИГ. 10А-10С). Интересно, что A1-25 превосходит A1-50 *in vitro*, и A1-50 превосходит A1-25 *ex vivo*. Не желая ограничиваться теорией, этот результат может быть обусловлен присущими различиями в эндоцитарной активности, проявляемой активированными первичными Т-клетками и иммортализованными Т-клетками.

Для дальнейшего подтверждения этих результатов проводят анализ «доза-ответ» на первичных Т-клетках человека, который показывает, что A1-25 и A1-50 поддерживают улучшение доставки иРНК в Т-клетки при дозировках в диапазоне от 60 до 400 нанограмм иРНК на 60000 клеток с небольшим или без значительного увеличения жизнеспособности клеток. Это предполагает, что A1-25 и A1-50 можно использовать в применениях *ex vivo*, таких как терапия CAR Т-клетками, для повышения эффективности доставки иРНК без увеличения токсичности по отношению к клеткам-мишеням.

Пример 10: Колокализация лучших составов LNP с эндосомами в Jurkat

Чтобы лучше понять влияние этих замещений гидроксистерина на эндосомальное поглощение и удержание, используют анализ колокализации для оценки накопления LNP в кислых органеллах в клетках Jurkat. LysoTracker используют для маркировки сферических кислых органелл, большинство из которых представляют собой эндосомы и лизосомы, в то время как LNP метят липофильным красителем DiO. A1-25 демонстрирует повышенную колокализацию с этими кислыми органеллами, что позволяет предположить, что частица A1-25 либо проникает в клетки с более высокой скоростью, либо остается в эндосомах в течение более длительных периодов времени (ФИГ. 11). Ранее было замечено, что для того, чтобы LNP высвобождали груз и обеспечивали транскрипцию иРНК, LNP должны достигать и оставаться в поздней эндосоме. Таким образом, либо увеличение поглощения частиц, либо более высокая частота достижения и оставления LNP в поздней эндосоме может объяснить такое усиление связи между A1-25 и кислыми органеллами в клетке.

Пример 11: Эндосомальная направленная миграция лучших составов LNP в Jurkat

Затем исследуют эффекты S2, A1-25 и A1-50 на поведение, связанное с эндосомальной направленной миграцией. В частности, оценивают три белка, которые связываются с различными стадиями эндосомы: Rab5, Rab7 и Rab11. Rab5 имеет тенденцию связываться с ранними эндосомами, что дает представление о поглощении клетками LNP. Rab7 ассоциируется с поздней эндосомой, и ранее было показано, что он является прямым предшественником стадии эндосомального высвобождения и функциональной доставки. Rab11 связывается с эндосомой рециркуляции, которая включает экзоцитоз эндоцитозированных LNP.

Как при низких, так и при высоких дозах, все три состава LNP снижают экспрессию Rab5 по сравнению с необработанными клетками (ФИГ. 12А-12В). Не желая ограничиваться теорией, этот феномен можно объяснить переходом ранних эндосом в поздние эндосомы посредством введения экзогенных материалов (*m.e.* LNP). Однако при

высоких дозах, экспрессия Rab5 как A1-25, так и A1-50 значительно увеличивается, приближаясь к уровням, наблюдаемым в необработанных клетках. Учитывая, что A1-25 и A1-50 показывают увеличение функциональной доставки иРНК к Jurkat при первоначальном скрининге, описанном в настоящем документе, высказано предположение, что это увеличение ранней генерации эндосом является результатом увеличения клеточного поглощения LNP, а не снижения ранней эндосомной прогрессии к поздней эндосоме. Не желая ограничиваться теорией, введение молекул гидроксистерина в составы LNP может вызывать морфологические изменения в LNP, которые влияют на клеточное поглощение.

Все три состава имеют увеличенные профили экспрессии Rab7 при обеих высоких дозах по сравнению с необработанными клетками. В низких дозах, A1-25 значительно улучшает экспрессию Rab7 по сравнению с S2. Это ожидаемый результат, учитывая, что поздние эндосомы наиболее тесно связаны с эндосомальным высвобождением, и A1-25 значительно усиливает доставку иРНК к Jurkat по сравнению с S2 в предыдущих скринингах. Однако при высоких дозах, существенной разницы между тремя составами не наблюдается.

Что касается пути рециркуляции, связанного с Rab11, A1-25 и A1-50 вызывают значительно более низкую экспрессию Rab11 при более низких дозах. В сочетании с результатами функциональной доставки, это снижение экспрессии позволяет предположить, что A1-25 и A1-50 имеют тенденцию находиться в поздней эндосоме и высвобождаться из нее, а не рециркулировать из клетки. В высоких дозах, A1-25 сохраняет эту тенденцию, но A1-50 больше не снижает существенно экспрессию Rab11.

В совокупности, экспрессия этих различных эндосомальных маркеров предполагает, что 25% и 50% замещение гидроксистерина не модифицированного холестерина заметно улучшает функциональную доставку иРНК к Т-клеткам за счет сочетания улучшенного клеточного поглощения, увеличения образования поздних эндосом и снижения эндосомального рециркулирования.

Пример 12: Оценка *in vitro* LNP, содержащих аналоги холестерина (*m.e.* желчные кислоты)

Настоящее изобретение дополнительно предлагает типовые данные, относящиеся к анализу *in vitro* составов LNP, содержащих выбранные желчные кислоты, включая, но не ограничиваясь ими, хенодесоксихолевую кислоту (CDCA), холевую кислоту (CA), дезоксихолевую кислоту (DCA), литохолевую кислоту (LCA), таурохолевую кислоту, гликохолевую кислоту, таурохенодесоксихолевую кислоту, гликохенодесоксихолевую кислоту (ФИГ. 13), где часть холестеринового компонента LNP заменена желчной кислотой. Составы LNP, содержащие замещения желчные кислоты-холестерин, готовят способом, аналогичным другим LNP, описанным в настоящем документе (Таблица 4).

Таблица 4. Отдельные типовые составы LNP, замещенных желчной кислотой

LNP	Желчная	Холестерин	C14-494	DOPE (%)	PEG-
-----	---------	------------	---------	----------	------

	кислота ^a (% моль)	(% моль)	(% моль)	моль)	конъюгированный липид (% моль)
CDCA-25	11,625	34,875	35	16	2,5
CDCA-50	23,25	23,25	35	16	2,5
CDCA-75	34,875	11,625	35	16	2,5
CDCA-100	46,5	0	35	16	2,5
CA-25	11,625	34,875	35	16	2,5
CA-50	23,25	23,25	35	16	2,5
CA-75	34,875	11,625	35	16	2,5
CA-100	46,5	0	35	16	2,5
DCA-25	11,625	34,875	35	16	2,5
DCA-50	23,25	23,25	35	16	2,5
DCA-75	34,875	11,625	35	16	2,5
DCA-100	46,5	0	35	16	2,5
LCA-25	11,625	34,875	35	16	2,5
LCA-50	23,25	23,25	35	16	2,5
LCA-75	34,875	11,625	35	16	2,5
LCA-100	46,5	0	35	16	2,5

^a Тип желчной кислоты указан в названии LNP (*например*, CDCA-25 включает желчную кислоту CDCA).

Замещенные желчной кислотой LNP, описанные в настоящем документе, в которые инкапсулирована иРНК люциферазы, оценивают *in vitro* на предмет доставки и/или экспрессии люциферазы в клеточных линиях Сасо-2, HeLa, HepG2, Jurkat и Raji (ФИГ. 14А-14Е). В некоторых вариантах осуществления, замещенные желчной кислотой LNP по настоящему изобретению демонстрируют превосходные результаты в эпителиальных клетках и клетках HeLa. В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению демонстрируют превосходные результаты в отношении лимфоцитов.

Пример 13: Оценка *in vivo* LNP, содержащих аналоги холестерина (*т.е.* желчные кислоты)

Настоящее изобретение дополнительно предлагает типовые данные, относящиеся к анализу *in vivo* составов LNP, содержащих выбранные желчные кислоты, где выбранные LNP идентифицированы при оценке *in vitro*, описанной в других местах настоящего документа, для дальнейшей оценки (*т.е.* CA-100, DCA-50 и LCA-75 LNP).

В некоторых вариантах осуществления, мышам внутрибрюшинно вводят LNP по настоящему изобретению, в которые инкапсулирована иРНК люциферазы, и оценивают доставку и/или экспрессию иРНК в органы-мишени (ФИГ. 15А-15В и ФИГ. 17А-17Е). В некоторых вариантах осуществления, Ca-100 значительно улучшает доставку в селезенку.

В некоторых вариантах осуществления, LCA-75 значительно улучшает доставку в тонкую кишку. В некоторых вариантах осуществления, LNP, содержащие замену холестерина на желчные кислоты, увеличивают доставку в тонкий кишечник и легкие.

В некоторых вариантах осуществления, мышам внутривенно вводят LNP по настоящему изобретению, в которые инкапсулирована иРНК люциферазы, и оценивают доставку и/или экспрессию иРНК в органы-мишени (ФИГ. 16А-16В).

В некоторых вариантах осуществления, SA-100, DCA-50 и LCA-75 увеличивают системную доставку во внепеченочные органы (*например*, легкие и тонкий кишечник). В некоторых вариантах осуществления, SA-100 увеличивает доставку в селезенку при внутривенном и/или внутривенном введении.

Пронумерованные варианты осуществления

Предложены следующие примерные варианты осуществления, нумерация которых не должна рассматриваться как обозначение уровней важности:

Вариант осуществления 1 предлагает липидные наночастицы (LNP), содержащие:

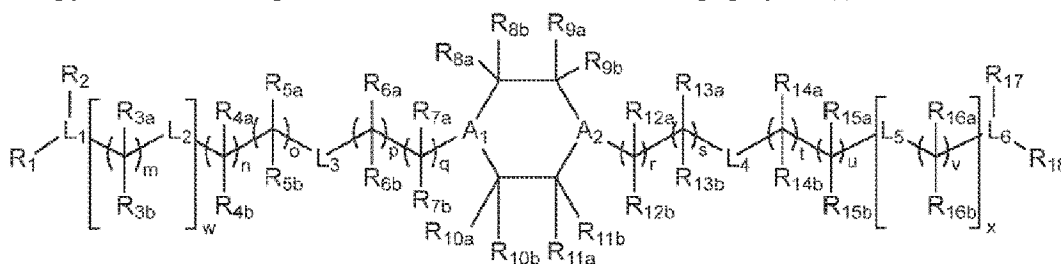
(a) по меньшей мере один ионизируемый липид, где ионизируемый липид составляет от примерно 10 до примерно 50% моль LNP;

(b) по меньшей мере один хелперный липид, где хелперный липид составляет от примерно 10% моль до примерно 45% моль LNP;

(c) по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из холестерина и заменителя холестерина, где комбинация холестерина и заменителя холестерина составляет от примерно 5% моль до примерно 50% моль LNP; и

(d) по меньшей мере, один полиэтиленгликоль (PEG) или PEG-конъюгированный липид, где PEG или PEG-конъюгированный липид составляет от примерно 0,5% моль до примерно 12,5% моль LNP.

Вариант осуществления 2 предлагает LNP по Варианту осуществления 1, где ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (I) или его соль или сольват:



Формула (I),

в которой:

A_1 и A_2 независимо выбраны из группы, состоящей из CH, N и P;

L_1 и L_6 каждый независимо выбран из группы, состоящей из CR_{19} и N;

каждый случай L_2 и L_5 независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CHR_{19}-$, $-O-$, $-NH-$ и $-NR_{19}-$;

L_3 и L_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CHR_{19}-$, $-O-$, $-NH-$ и $-NR_{19}-$;

каждый случай $R_1, R_2, R_{3a}, R_{3b}, R_{4a}, R_{4b}, R_{5a}, R_{5b}, R_{6a}, R_{6b}, R_{7a}, R_{7b}, R_{8a}, R_{8b}, R_{9a}, R_{9b}, R_{10a}, R_{10b}, R_{11a}, R_{11b}, R_{12a}, R_{12b}, R_{13a}, R_{13b}, R_{14a}, R_{14b}, R_{15a}, R_{15b}, R_{16a}, R_{16b}, R_{17}, R_{18}$ и R_{19} независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, $-Y(R_{20})_{z'}(R_{21})_{z''}$ (необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, $-Y(R_{20})_{z'}(R_{21})_{z''}$ (необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкил), необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, $-Y(R_{20})_{z'}(R_{21})_{z''}$ (необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила), необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, $-Y(R_{20})_{z'}(R_{21})_{z''}$ (необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила), необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, $-Y(R_{20})_{z'}(R_{21})_{z''}$ (необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила), необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила, $-Y(R_{20})_{z'}(R_{21})_{z''}$ (необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила), C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1 - C_{28} аминоалкила, C_2 - C_{28} аминоалкенила, C_2 - C_{28} аминоалкинила, C_6 - C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1 - C_{28} гидроксиалкила, C_2 - C_{28} гидроксиалкенила, C_2 - C_{28} гидроксиалкинила, C_6 - C_{10} гидроксиарила, C_1 - C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата, сложного эфира, $-Y(R_{20})_{z'}(R_{21})_{z''}$ -эфира, $-Y(R_{20})_{z'}(R_{21})_{z''}$, $-NO_2$, $-CN$ и сульфокси,

или два геминальных заместителя, выбранных из R_{3a} и R_{3b}, R_{4a} и R_{4b}, R_{5a} и R_{5b}, R_{6a} и R_{6b}, R_{7a} и R_{7b}, R_{8a} и R_{8b}, R_{9a} и R_{9b}, R_{10a} и R_{10b}, R_{11a} и R_{11b}, R_{12a} и R_{12b}, R_{13a} и R_{13b}, R_{14a} и R_{14b} или R_{15a} и R_{15b} могут быть объединены с атомом C, с которым они связаны, с образованием $C=O$;

каждый случай Y независимо выбран из группы, состоящей из C, N, O, S и P;

каждый случай R_{20} и R_{21} независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила, C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1 - C_{28} аминоалкила, C_2 - C_{28} аминоалкенила, C_2 - C_{28} аминоалкинила, C_6 - C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1 - C_{28} гидроксиалкила, C_2 - C_{28} гидроксиалкенила, C_2 - C_{28} гидроксиалкинила, C_6 - C_{10} гидроксиарила, C_1 - C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата, сложного эфира, $-NO_2$, $-CN$ и сульфокси,

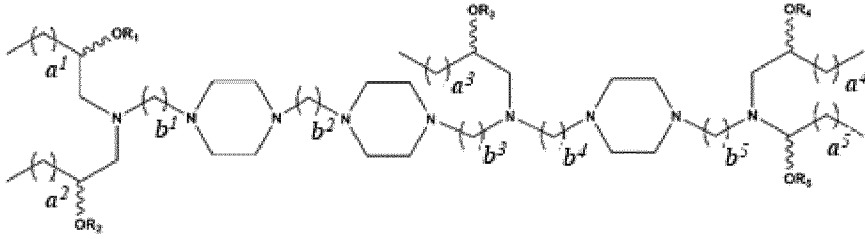
или R_{20} и R_{21} могут быть объединены с атомом Y, с которым они связаны, с образованием $C=O$);

каждый случай z' и z'' независимо равен 0, 1 или 2; и

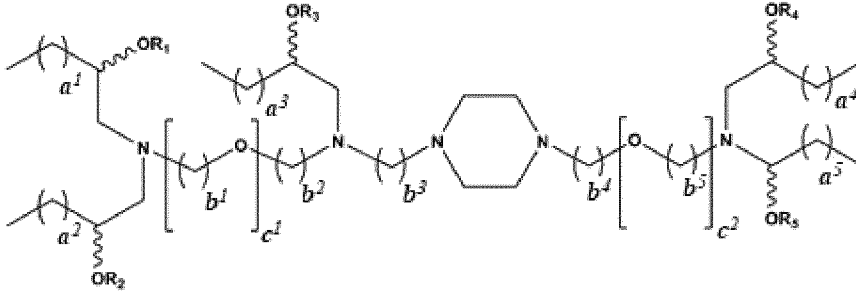
каждый случай m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w и x независимо равен 0, 1, 2; 3, 4 или 5.

Вариант осуществления 3 предлагает LNP по Варианту осуществления 2, где

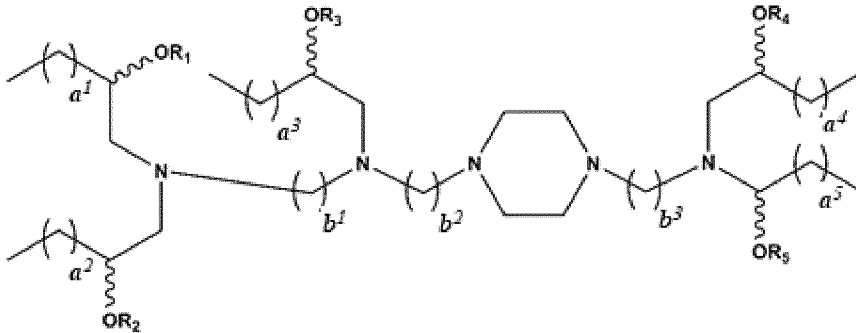
ионизируемый липид формулы (I) выбран из группы, состоящей из:



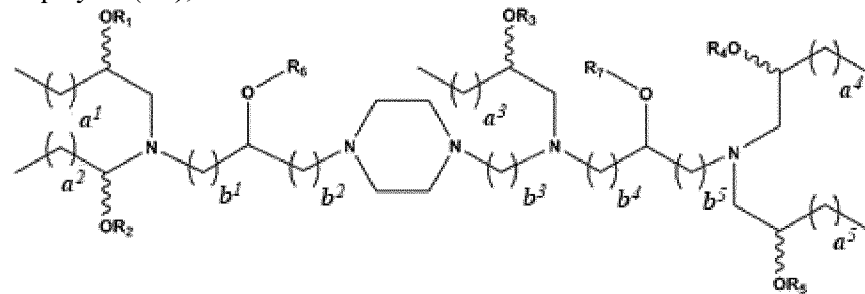
Формула (II),



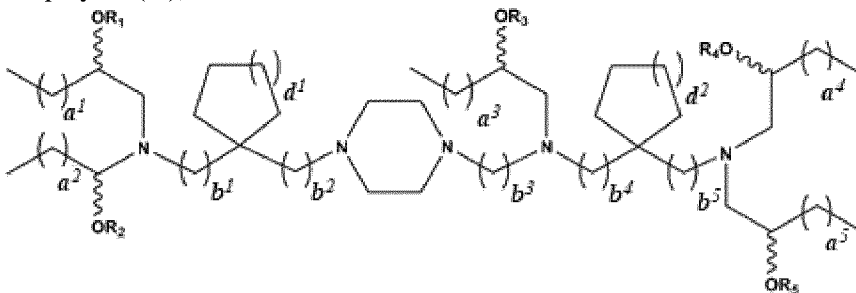
Формула (III),



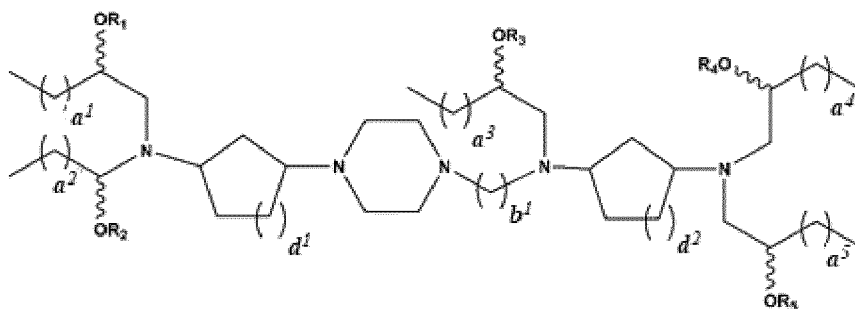
Формула (IV),



Формула (V),



Формула (VI) и



Формула (VII),

в которой:

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ и R_7 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила, C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2, NH_2, C_1$ - C_{28} аминоалкила, C_2 - C_{28} аминоалкенила, C_2 - C_{28} аминоалкинила, C_6 - C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1 - C_{28} гидроксильного алкила, C_2 - C_{28} гидроксильного алкенила, C_2 - C_{28} гидроксильного алкинила, C_6 - C_{10} гидроксильного арила, C_1 - C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата и сложного эфира;

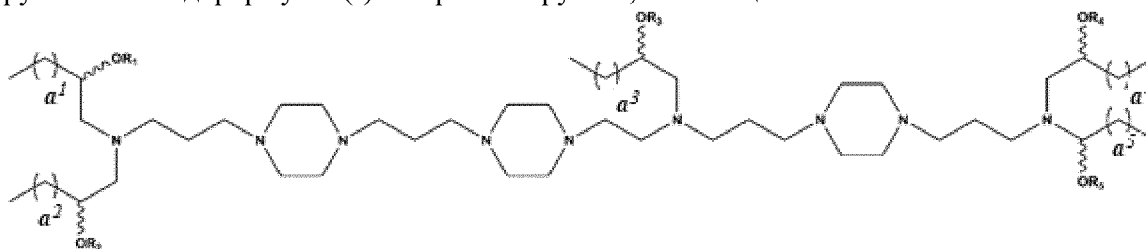
a^1, a^2, a^3, a^4 и a^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

b^1, b^2, b^3, b^4 и b^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

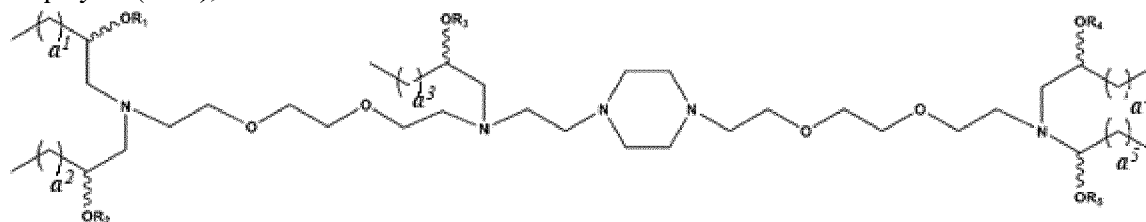
c^1 и c^2 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5; и

d^1 и d^2 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

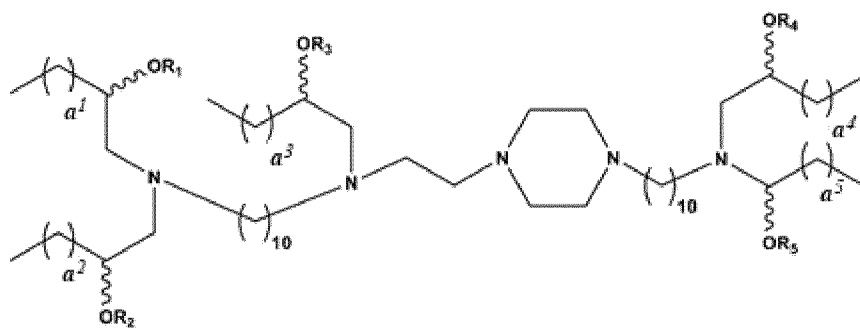
Вариант осуществления 4 предлагает LNP по Варианту осуществления 2, где ионизируемый липид формулы (I) выбран из группы, состоящей из:



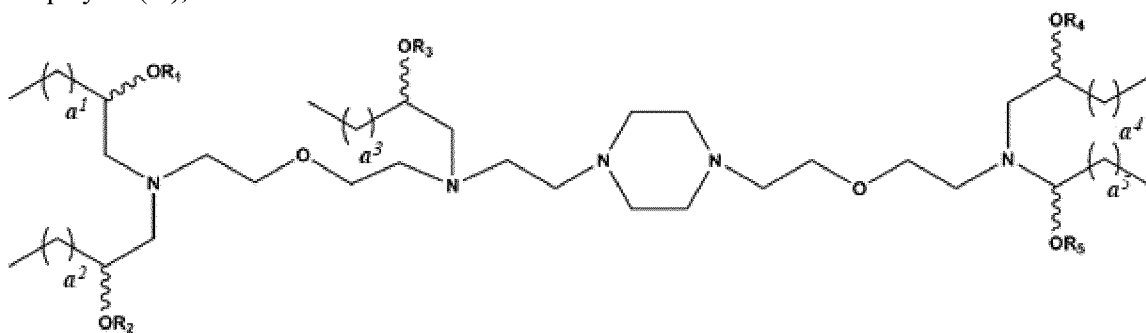
Формула (VIII),



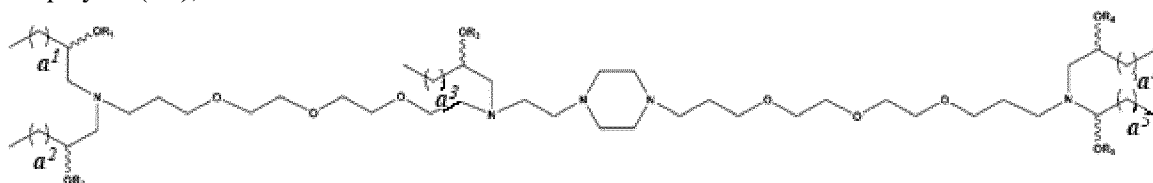
Формула (IX),



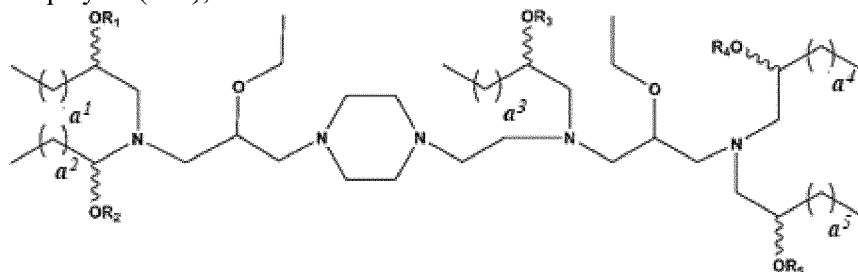
Формула (X),



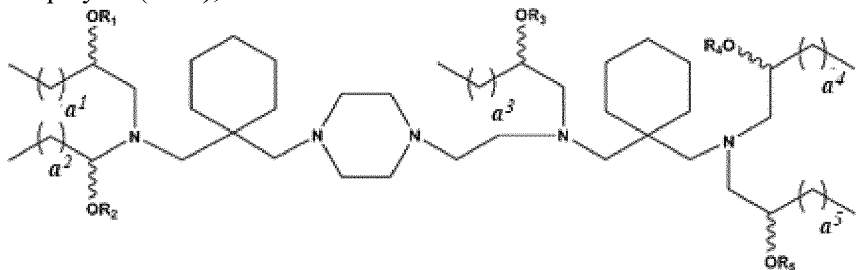
Формула (XI),



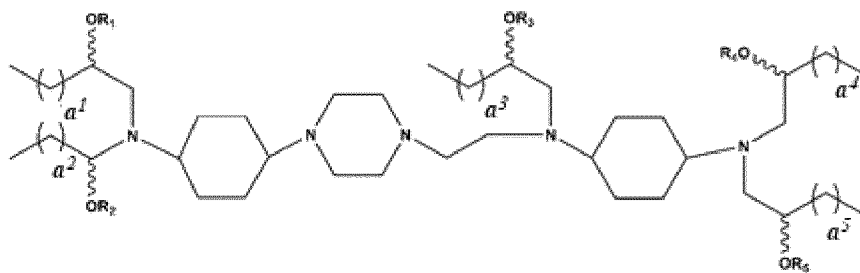
Формула (XII),



Формула (XIII),



Формула (XIV) и



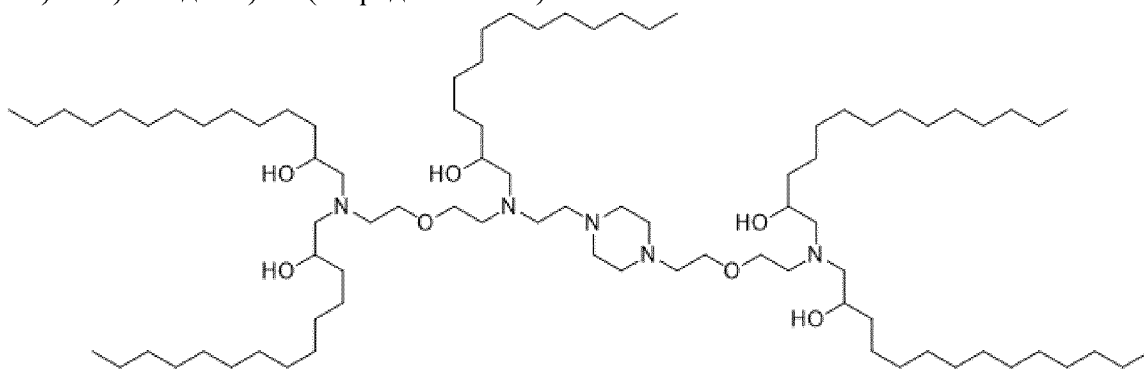
Формула (XV),

в которой:

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила, C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1 - C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1 - C_{28} аминоалкила, C_2 - C_{28} аминоалкенила, C_2 - C_{28} аминоалкинила, C_6 - C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1 - C_{28} гидроксиалкила, C_2 - C_{28} гидроксиалкенила, C_2 - C_{28} гидроксиалкинила, C_6 - C_{10} гидроксиарила, C_1 - C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата и сложного эфира; и

a^1 , a^2 , a^3 , a^4 и a^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

Вариант осуществления 5 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 2-4, где ионизируемый липид формулы (I) содержит 1,1'-((2-(2-(4-(2-((2-(2-(бис(2-гидрокситетрадецил)амино)этокси)этил)(2-гидрокситетрадецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этокси)этил)азандиил)бис(тетрадекан-2-ол):



(C14-4).

Вариант осуществления 6 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5, где заменителем холестерина является дексаметазон.

Вариант осуществления 7 предлагает LNP по Варианту осуществления 6, где холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение, выбранное из группы, состоящей из 9:1, 8:2, 7:3 и 5:5 (холестерин:дексаметазон).

Вариант осуществления 8 предлагает LNP по Варианту осуществления 6 или 7, где LNP содержит по меньшей мере один липид, выбранный из группы, состоящей из MC3 и C12-200.

Вариант осуществления 9 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 6-8, где хелперный липид представляет собой 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPC).

Вариант осуществления 10 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 6-9, где PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (C14PEG-2000).

Вариант осуществления 11 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 6-10, где молярное соотношение (a):(b):(c):(d) составляет примерно 50:10:38,5:1,5.

Вариант осуществления 12 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5, где заменитель холестерина выбран из группы, состоящей из гидроксизамещенного холестерина, эпоксизамещенного холестерина и кетозамещенного холестерина.

Вариант осуществления 13 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 12, где заменитель холестерина выбран из группы, состоящей из 7- α -гидроксистерина, 7- β -гидроксистерина, 19-гидроксистерина, 20-(S)-гидроксистерина, 24-(S)-гидроксистерина, 25-гидроксистерина, 7-кетохолестерина, 5,6-эпоксистерина, 3 β ,5 α ,6 β -тригидроксистерина, 4 β -гидроксистерина, 27-гидроксистерина и 22-(R)-гидроксистерина.

Вариант осуществления 14 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 12-13, где холестерин и заменитель холестерина имеют молярное процентное соотношение, выбранное из группы, состоящей примерно из 50:50, 75:25, 87,5:12,5 и примерно 0:100 (холестерин:заменитель холестерина).

Вариант осуществления 15 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 12-14, где хелперный липид представляет собой диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE).

Вариант осуществления 16 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 12-15, где PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (C14PEG-2000).

Вариант осуществления 17 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 12-16, где молярное соотношение (a):(b):(c):(d) составляет примерно 30:16:46,5:2,5.

Вариант осуществления 18 предлагает LNP по Варианту осуществления 17, где (c) содержит холестерин и 7- α -гидроксистерин, где холестерин и 7 α -гидроксистерин имеют молярное соотношение, выбранное из группы, состоящей из 50:50 и 75:25 (холестерин:7- α -гидроксистерин).

Вариант осуществления 19 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5, где заменителем холестерина является карбоксизамещенный холестерин.

Вариант осуществления 20 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 19, где заменителем холестерина является желчная кислота.

Вариант осуществления 21 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 19-20, где заменитель холестерина выбран из группы, состоящей из хенодесоксихолевой кислоты (CDCA), холевой кислоты (CA), дезоксихолевой кислоты (DCA), литохолевой кислоты (LCA), таурохолевой кислоты, гликохолевой кислоты, таурохолендесоксихолевой кислоты и гликохолендесоксихолевой кислоты.

Вариант осуществления 22 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 19-21, где холестерин и заменитель холестерина имеют молярное соотношение, выбранное из группы, состоящей из 25:100, 50:50, 75:25 и 100:0 (заменитель холестерина:холестерин).

Вариант осуществления 23 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 19-22, где хелперный липид содержит диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE).

Вариант осуществления 24 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 19-23, где PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (C14PEG-2000).

Вариант осуществления 25 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-5 и 19-24, где молярное соотношение (a):(b):(c):(d) составляет примерно 35:16:46,5:2,5.

Вариант осуществления 26 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-25, где LNP дополнительно содержит по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты и терапевтического агента.

Вариант осуществления 27 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-26, где LNP дополнительно содержит по меньшей мере один агент, выбранный из группы, состоящей из иРНК, миРНК, микроРНК, CRISPR-Cas9, малой молекулы, белка и антитела.

Вариант осуществления 28 предлагает LNP по Варианту осуществления 26, где LNP содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 29 предлагает LNP по Варианту осуществления 28, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

Вариант осуществления 30 предлагает LNP по Варианту осуществления 28 или 29, где молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из кДНК, иРНК, микроРНК, миРНК, модифицированной РНК, антагомира, антисмысловой молекулы и таргетированной нуклеиновой кислоты или любой их комбинации.

Вариант осуществления 31 предлагает LNP по Варианту осуществления 28, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

Вариант осуществления 32 предлагает LNP по Варианту осуществления 31, где CAR специфичен к связыванию с поверхностным антигеном патогенной клетки или опухолевой клетки.

Вариант осуществления 33 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-32, где LNP дополнительно содержит таргетирующий домен, специфичный для связывания с представляющей интерес клеткой-мишенью.

Вариант осуществления 34 предлагает LNP по Варианту осуществления 33, где клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из мононуклеарных клеток периферической

крови и иммунной клетки.

Вариант осуществления 35 предлагает LNP по любому из Вариантов осуществления 1-34, где LNP содержит домен, таргетирующий иммунную клетку, специфичный для связывания с Т-клеткой.

Вариант осуществления 36 предлагает LNP по Варианту осуществления 35, где таргетирующий домен специфически связывается по меньшей мере с одной поверхностной молекулой, выбранной из группы, состоящей из CD1, CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD16, CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD38, CD39, CD40L, CD44, CD45, CD62L, CD69, CD73, CD80, CD83, CD86, CD95, CD103, CD119, CD126, CD150, CD153, CD154, CD161, CD183, CD223, CD254, CD275, CD45RA, CXCR3, CXCR5, FasL, IL18R1, CTLA-4, OX40, GITR, LAG3, ICOS, PD-1, leu-12, TCR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, NKG2D, CCR, CCR1, CCR2, CCR4, CCR6 и CCR7.

Вариант осуществления 37 предлагает фармацевтическую композицию, содержащую LNP по любому из Вариантов осуществления 1-36 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 38 предлагает фармацевтическую композицию по Варианту осуществления 37, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит адъювант.

Вариант осуществления 39 предлагает фармацевтическую композицию по Варианту осуществления 37 или 38, где фармацевтическая композиция представляет собой вакцину.

Вариант осуществления 40 предлагает способ доставки по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты и терапевтического агента, к клетке-мишени у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одной LNP по любому из Вариантов осуществления 1-36 и/или фармацевтической композиции по любому из Вариантов осуществления 37-39.

Вариант осуществления 41 предлагает способ по Варианту осуществления 40, где терапевтический агент представляет собой по меньшей мере один агент, выбранный из группы, состоящей из иРНК, миРНК, микроРНК, CRISPR-Cas9, малой молекулы, белка и антитела.

Вариант осуществления 42 предлагает способ по Варианту осуществления 40, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из молекулы ДНК и молекулы РНК.

Вариант осуществления 43 предлагает способ по Варианту осуществления 40, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из кДНК, иРНК, микроРНК, миРНК, антагомира, антисмысловой молекулы и таргетированной нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 44 предлагает способ по Варианту осуществления 40, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

Вариант осуществления 45 предлагает способ по Варианту осуществления 44, где CAR специфичен к связыванию с поверхностным антигеном патогенной клетки или

опухолевой клетки.

Вариант осуществления 46 предлагает способ по любому из Вариантов осуществления 40-45, где клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, мононуклеарной клетки периферической крови и иммунной клетки.

Вариант осуществления 47 предлагает способ по Варианту осуществления 45 или 46, где CAR содержит домен, таргетирующий клетку, специфичный для связывания с Т-клеткой.

Вариант осуществления 48 предлагает способ по Варианту осуществления 47, где домен, таргетирующий клетку, специфичен для связывания по меньшей мере с одним, выбранным из группы, состоящей из CD1, CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD16, CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD38, CD39, CD40L, CD44, CD45, CD62L, CD69, CD73, CD80, CD83, CD86, CD95, CD103, CD119, CD126, CD150, CD153, CD154, CD161, CD183, CD223, CD254, CD275, CD45RA, CXCR3, CXCR5, FasL, IL18R1, CTLA-4, OX40, GITR, LAG3, ICOS, PD-1, leu-12, TCR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, NKG2D, CCR, CCR1, CCR2, CCR4, CCR6 и CCR7.

Вариант осуществления 49 предлагает способ по любому из Вариантов осуществления 40-48, где LNP или его фармацевтическая композиция дополнительно содержит адъювант.

Вариант осуществления 50 предлагает способ по любому из Вариантов осуществления 40-49, где молекула нуклеиновой кислоты и/или терапевтический агент по меньшей мере частично инкапсулирован в LNP.

Вариант осуществления 51 предлагает способ по любому из Вариантов осуществления 40-50, где способ лечит, предотвращает и/или улучшает состояние по меньшей мере одного заболевания, выбранного из группы, состоящей из вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, паразитарной инфекции, рака или заболевания или нарушения, ассоциированного с раком.

Термины и выражения, используемые в настоящем документе, используются в качестве терминов описания, а не ограничения, и использование таких терминов и выражений не подразумевает исключения каких-либо эквивалентов показанных и описанных функций или их частей, но признается, что различные модификации возможны в рамках вариантов осуществления настоящей заявки. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящая заявка описывает конкретные варианты осуществления и необязательные признаки, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к модификации и вариациям раскрытых в настоящем документе композиций, способов и концепций, и что такие модификации и вариации считаются входящими в объем вариантов осуществления настоящей заявки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липидная наночастица (LNP), содержащая:

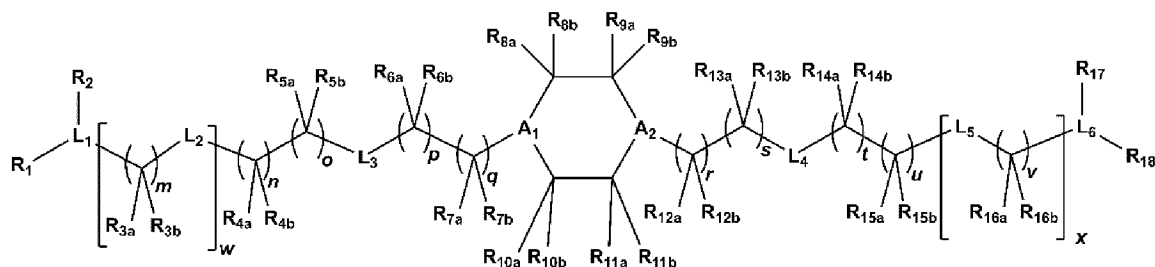
(a) по меньшей мере один ионизируемый липид, где ионизируемый липид составляет от примерно 10 до примерно 50% моль LNP;

(b) по меньшей мере один хелперный липид, где хелперный липид составляет от примерно 10% моль до примерно 45% моль LNP;

(c) по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из холестерина и заменителя холестерина, где комбинация холестерина и заменителя холестерина составляет от примерно 5% моль до примерно 50% моль LNP; и

(d) по меньшей мере один полиэтиленгликоль (PEG) или PEG-конъюгированный липид, где PEG или PEG-конъюгированный липид составляет от примерно 0,5% моль до примерно 12,5% моль LNP.

2. LNP по п. 1, где ионизируемый липид представляет собой соединение формулы (I) или его соль или сольват:



Формула (I),

в которой:

A_1 и A_2 независимо выбраны из группы, состоящей из CH, N и P;

L_1 и L_6 каждый независимо выбран из группы, состоящей из CR_{19} и N;

каждый случай L_2 и L_5 независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CHR_{19}-$, $-O-$, $-NH-$ и $-NR_{19}-$;

L_3 и L_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CHR_{19}-$, $-O-$, $-NH-$ и $-NR_{19}-$;

каждый случай R_1 , R_2 , R_{3a} , R_{3b} , R_{4a} , R_{4b} , R_{5a} , R_{5b} , R_{6a} , R_{6b} , R_{7a} , R_{7b} , R_{8a} , R_{8b} , R_{9a} , R_{9b} , R_{10a} , R_{10b} , R_{11a} , R_{11b} , R_{12a} , R_{12b} , R_{13a} , R_{13b} , R_{14a} , R_{14b} , R_{15a} , R_{15b} , R_{16a} , R_{16b} , R_{17} , R_{18} и R_{19} независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, $-Y(R_{20})_z \cdot (R_{21})_z \cdot$ (необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, $-Y(R_{20})_z \cdot (R_{21})_z \cdot$ (необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила), необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, $-Y(R_{20})_z \cdot (R_{21})_z \cdot$ (необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила), необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила, $-Y(R_{20})_z \cdot (R_{21})_z \cdot$ (необязательно замещенного C_6 - C_{12} циклоалкинила), необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила, $-Y(R_{20})_z \cdot (R_{21})_z \cdot$ (необязательно замещенного C_6 - C_{10} арила), необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероарила, $-Y(R_{20})_z \cdot (R_{21})_z \cdot$ (необязательно

замещенного C₂-C₁₂ гетероарила), C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, линейного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, разветвленного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, C(=O)NH₂, NH₂, C₁-C₂₈ аминоалкила, C₂-C₂₈ аминоалкенила, C₂-C₂₈ аминоалкинила, C₆-C₁₀ аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C₁-C₂₈ гидроксиалкила, C₂-C₂₈ гидроксиалкенила, C₂-C₂₈ гидроксиалкинила, C₆-C₁₀ гидроксиарила, C₁-C₂₈ алкокси, карбоксила, карбоксилата, сложного эфира, -Y(R₂₀)_z(R₂₁)_{z'}-эфира, -Y(R₂₀)_z(R₂₁)_{z'}, -NO₂, -CN и сульфокси,

или два геминальных заместителя, выбранных из R_{3a} и R_{3b}, R_{4a} и R_{4b}, R_{5a} и R_{5b}, R_{6a} и R_{6b}, R_{7a} и R_{7b}, R_{8a} и R_{8b}, R_{9a} и R_{9b}, R_{10a} и R_{10b}, R_{11a} и R_{11b}, R_{12a} и R_{12b}, R_{13a} и R_{13b}, R_{14a} и R_{14b} или R_{15a} и R_{15b} могут быть объединены с атомом C, с которым они связаны, с образованием C=O;

каждый случай Y независимо выбран из группы, состоящей из C, N, O, S и P;

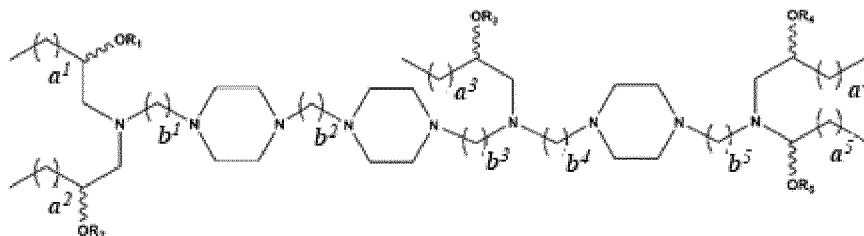
каждый случай R₂₀ и R₂₁ независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C₁-C₂₈ алкила, необязательно замещенного C₃-C₁₂ циклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероциклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероциклоалкила, необязательно замещенного C₂-C₂₈ алкенила, необязательно замещенного C₅-C₁₂ циклоалкенила, необязательно замещенного C₂-C₂₈ алкинила, необязательно замещенного C₆-C₁₂ циклоалкинила, необязательно замещенного C₆-C₁₀ арила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероарила, C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, линейного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, разветвленного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, C(=O)NH₂, NH₂, C₁-C₂₈ аминоалкила, C₂-C₂₈ аминоалкенила, C₂-C₂₈ аминоалкинила, C₆-C₁₀ аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C₁-C₂₈ гидроксиалкила, C₂-C₂₈ гидроксиалкенила, C₂-C₂₈ гидроксиалкинила, C₆-C₁₀ гидроксиарила, C₁-C₂₈ алкокси, карбоксила, карбоксилата, сложного эфира, -NO₂, -CN и сульфокси,

или R₂₀ и R₂₁ могут быть объединены с атомом Y, с которым они связаны, с образованием C=O);

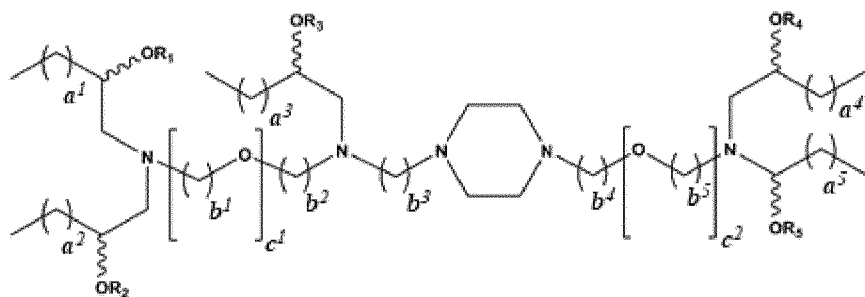
каждый случай z' и z'' независимо равен 0, 1 или 2; и

каждый случай m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w и x независимо равен 0, 1, 2; 3, 4 или 5.

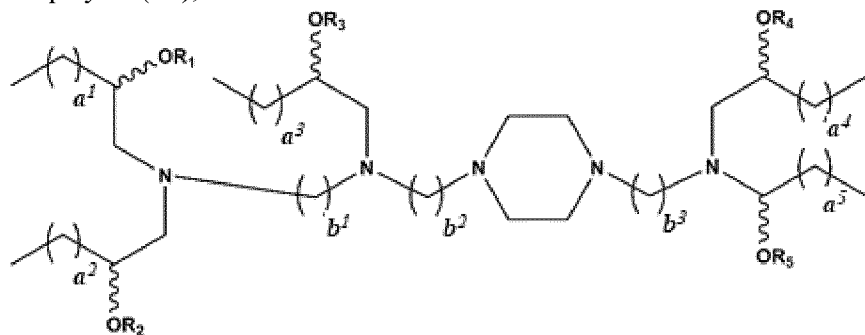
3. LNP по п. 2, где ионизируемый липид формулы (I) выбран из группы, состоящей из:



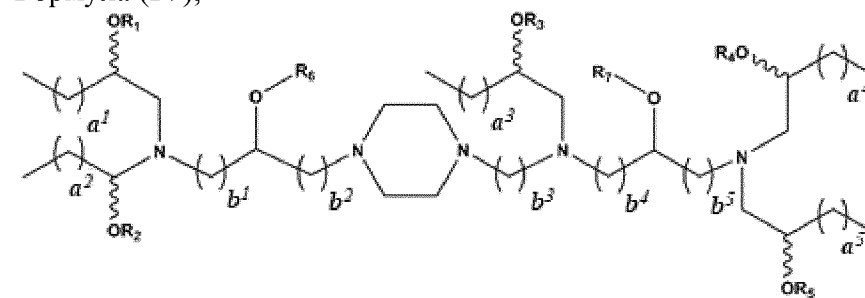
Формула (II),



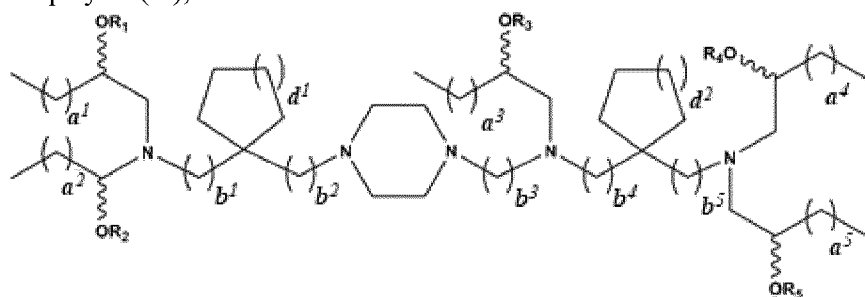
Формула (III),



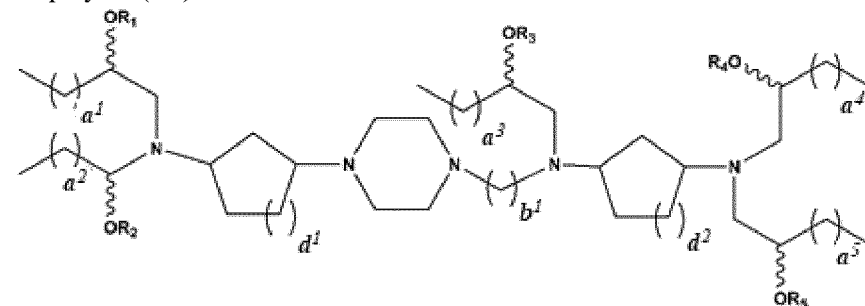
Формула (IV),



Формула (V),



Формула (VI) и



Формула (VII),

в которой:

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ и R_7 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1-C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3-C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2-C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2-C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5-C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2-C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6-C_{12} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6-C_{10} арила, необязательно замещенного C_2-C_{12} гетероарила, C_1-C_{28} алкоксикарбонила, линейного C_1-C_{28} алкоксикарбонила, разветвленного C_1-C_{28} алкоксикарбонила, $C(=O)NH_2$, NH_2 , C_1-C_{28} аминоалкила, C_2-C_{28} аминоалкенила, C_2-C_{28} аминоалкинила, C_6-C_{10} аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C_1-C_{28} гидроксиалкила, C_2-C_{28} гидроксиалкенила, C_2-C_{28} гидроксиалкинила, C_6-C_{10} гидроксиарила, C_1-C_{28} алкокси, карбоксила, карбоксилата и сложного эфира;

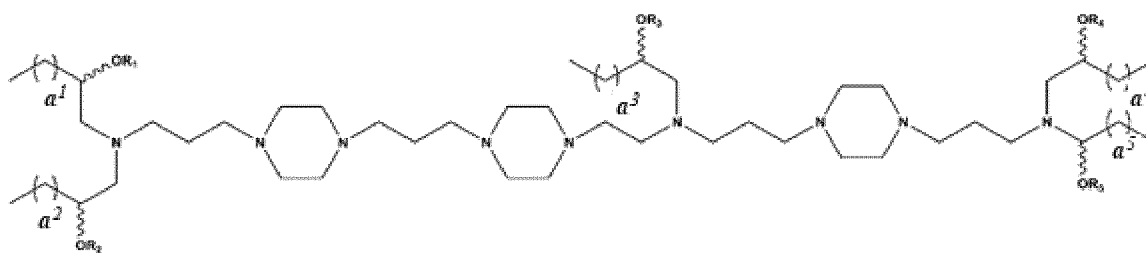
a^1, a^2, a^3, a^4 и a^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

b^1, b^2, b^3, b^4 и b^5 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

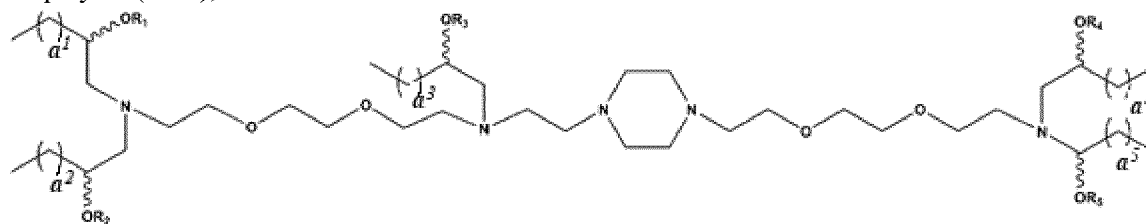
c^1 и c^2 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5; и

d^1 и d^2 каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

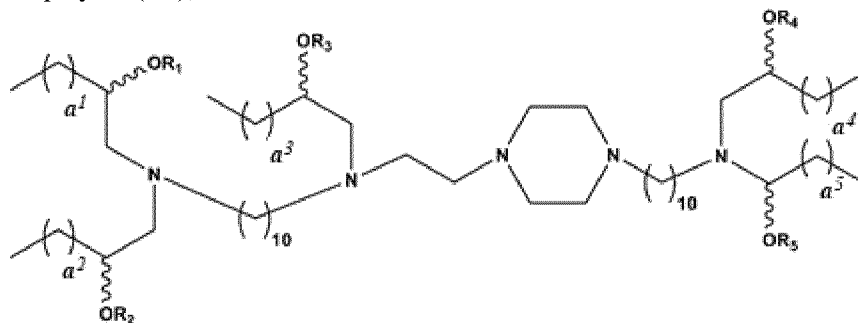
4. LNP по п. 2, где ионизируемый липид формулы (I) выбран из группы, состоящей из:



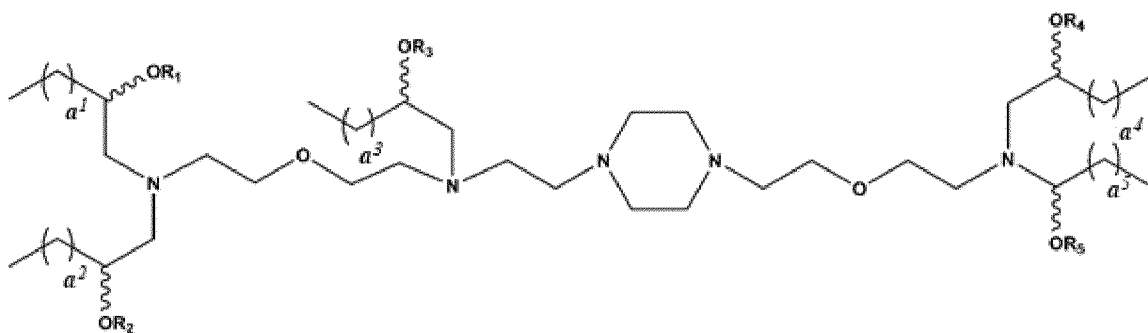
Формула (VIII),



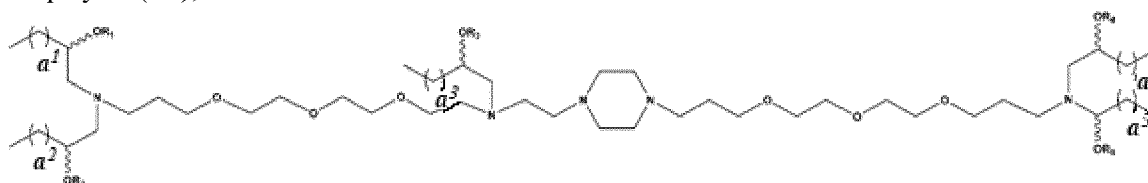
Формула (IX),



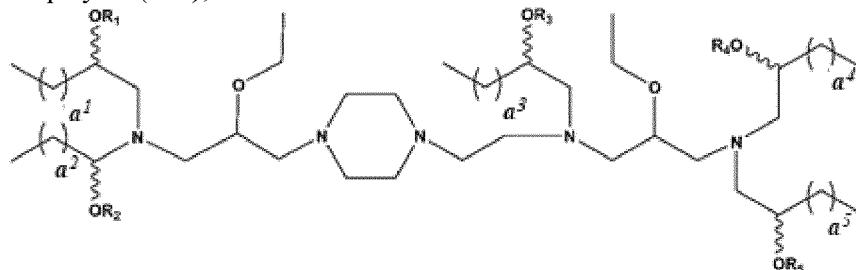
Формула (X),



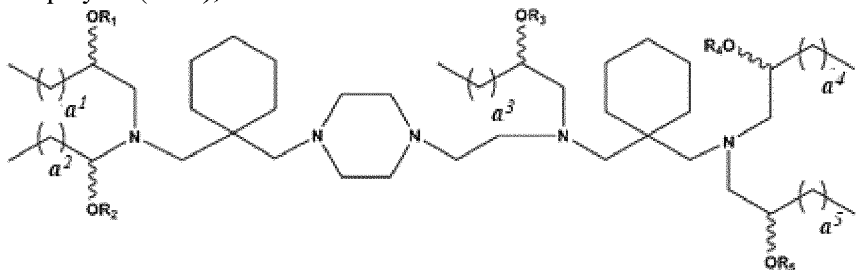
Формула (XI),



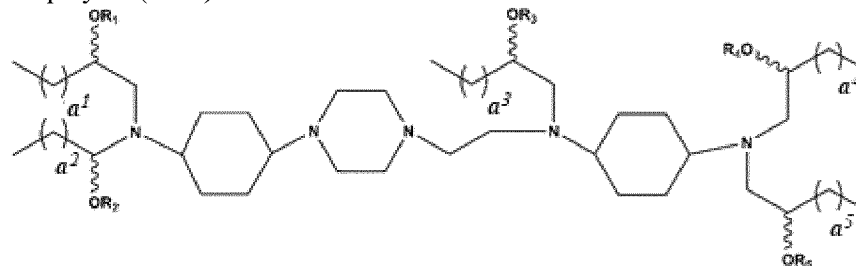
Формула (XII),



Формула (XIII),



Формула (XIV) и



Формула (XV),

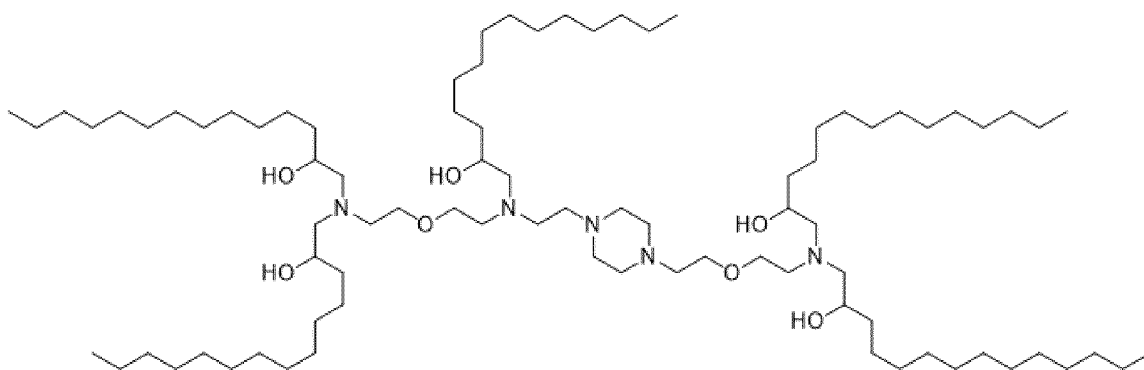
в которой:

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 и R_5 каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена, необязательно замещенного C_1 - C_{28} алкила, необязательно замещенного C_3 - C_{12} циклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{12} гетероциклоалкила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкенила, необязательно замещенного C_5 - C_{12} циклоалкенила, необязательно замещенного C_2 - C_{28} алкинила, необязательно замещенного C_6 - C_{12}

циклоалкинила, необязательно замещенного C₆-C₁₀ арила, необязательно замещенного C₂-C₁₂ гетероарила, C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, линейного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, разветвленного C₁-C₂₈ алкоксикарбонила, C(=O)NH₂, NH₂, C₁-C₂₈ аминоалкила, C₂-C₂₈ аминоалкенила, C₂-C₂₈ аминоалкинила, C₆-C₁₀ аминоарила, аминоацетата, ацила, OH, C₁-C₂₈ гидроксиалкила, C₂-C₂₈ гидроксиалкенила, C₂-C₂₈ гидроксиалкинила, C₆-C₁₀ гидроксиарила, C₁-C₂₈ алкокси, карбоксила, карбоксилата и сложного эфира; и

a¹, a², a³, a⁴ и a⁵ каждый независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

5. LNP по любому из пп. 2-4, где ионизируемый липид формулы (I) содержит 1,1'-((2-(2-(4-(2-((2-(2-(бис(2-гидрокситетрадецил)амино)этокси)этил)(2-гидрокситетрадецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этокси)этил)азандиил)бис(тетрадекан-2-ол):



(C14-4).

6. LNP по любому из пп. 1-5, где заменителем холестерина является дексаметазон.

7. LNP по п.6, где холестерин и заменитель холестерина имеют массовое соотношение, выбранное из группы, состоящей из 9:1, 8:2, 7:3 и 5:5 (холестерин:дексаметазон).

8. LNP по п. 6 или 7, где LNP содержит по меньшей мере один липид, выбранный из группы, состоящей из MC3 и C12-200.

9. LNP по любому из пп. 6-8, где хелперный липид представляет собой 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPC).

10. LNP по любому из пп. 6-9, где PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (C14PEG-2000).

11. LNP по любому из пп. 6-10, где молярное соотношение (a):(b):(c):(d) составляет примерно 50:10:38,5:1,5.

12. LNP по любому из пп. 1-5, где заменитель холестерина выбран из группы, состоящей из гидроксизамещенного холестерина, эпоксизамещенного холестерина и кетозамещенного холестерина.

13. LNP по любому из пп. 1-5 и 12, где заменитель холестерина выбран из группы, состоящей из 7- α -гидроксихолестерина, 7- β -гидроксихолестерина, 19-

гидроксихолестерина, 20-(S)-гидроксихолестерина, 24-(S)-гидроксихолестерина, 25-гидроксихолестерина, 7-кетохолестерина, 5,6-эпоксихолестерина, 3 β ,5 α ,6 β -тригидроксихолестерина, 4 β -гидроксихолестерина, 27-гидроксихолестерина и 22-(R)-гидроксихолестерина.

14. LNP по любому из пп. 1-5 и 12-13, где холестерин и заменитель холестерина имеют молярное процентное соотношение, выбранное из группы, состоящей из примерно 50:50, 75:25, 87,5:12,5 и примерно 0: 100 (холестерин:заменитель холестерина).

15. LNP по любому из пп. 1-5 и 12-14, где хелперный липид представляет собой диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE).

16. LNP по любому из пп. 1-5 и 12-15, где PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (C14PEG-2000).

17. LNP по любому из пп. 1-5 и 12-16, где молярное соотношение (a):(b):(c):(d) составляет примерно 30:16:46,5:2,5.

18. LNP по п. 17, где (c) содержит холестерин и 7- α -гидроксихолестерин, где молярное соотношение холестерина и 7 α -гидроксихолестерина выбрано из группы, состоящей из 50:50 и 75:25 (холестерин:7- α - гидроксихолестерин).

19. LNP по любому из пп. 1-5, где заменитель холестерина представляет собой карбоксизамещенный холестерин.

20. LNP по любому из пп. 1-5 и 19, где заменитель холестерина представляет собой желчную кислоту.

21. LNP по любому из пп. 1-5 и 19-20, где заменитель холестерина выбран из группы, состоящей из хенодезоксихолевой кислоты (CDCA), холевой кислоты (CA), дезоксихолевой кислоты (DCA), литохолевой кислоты (LCA), таурохолевой кислоты, гликохолевой кислоты, таурохенодезоксихолевой кислоты и гликохенодезоксихолевой кислоты.

22. LNP по любому из пп. 1-5 и 19-21, где холестерин и заменитель холестерина имеют молярное соотношение, выбранное из группы, состоящей из 25:100, 50:50, 75:25 и 100:0 (заменитель холестерина:холестерин).

23. LNP по любому из пп. 1-5 и 19-22, где хелперный липид содержит диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE).

24. LNP по любому из пп. 1-5 и 19-23, где PEG или PEG-конъюгированный липид содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(метокси(полиэтиленгликоль)-2000) (C14PEG-2000).

25. LNP по любому из пп. 1-5 и 19-24, где молярное соотношение (a):(b):(c):(d) составляет примерно 35:16:46,5:2,5.

26. LNP по любому из пп. 1-25, где LNP дополнительно содержит по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты и терапевтического агента.

27. LNP по любому из пп. 1-26, где LNP дополнительно содержит по меньшей мере

один агент, выбранный из группы, состоящей из иРНК, миРНК, микроРНК, CRISPR-Cas9, малой молекулы, белка и антитела.

28. LNP по п. 26, где LNP содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

29. LNP по п. 28, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

30. LNP по п. 28 или 29, где молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из кДНК, иРНК, микроРНК, миРНК, модифицированной РНК, антагомира, антисмысловой молекулы и таргетированной нуклеиновой кислоты или любой их комбинации.

31. LNP по п. 28, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

32. LNP по п. 31, где CAR специфичен в отношении связывания с поверхностным антигеном патогенной клетки или опухолевой клетки.

33. LNP по любому из пп. 1-32, где LNP дополнительно содержит таргетирующий домен, специфичный для связывания с представляющей интерес клеткой-мишенью.

34. LNP по п. 33, где клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из мононуклеарной клетки периферической крови и иммунной клетки.

35. LNP по любому из пп. 1-34, где LNP содержит домен, таргетирующий иммунную клетку, специфичный для связывания с Т-клеткой.

36. LNP по п. 35, где таргетирующий домен специфически связывается по меньшей мере с одной поверхностной молекулой, выбранной из группы, состоящей из CD1, CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD16, CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD38, CD39, CD40L, CD44, CD45, CD62L, CD69, CD73, CD80, CD83, CD86, CD95, CD103, CD119, CD126, CD150, CD153, CD154, CD161, CD183, CD223, CD254, CD275, CD45RA, CXCR3, CXCR5, FasL, IL18R1, CTLA-4, OX40, GITR, LAG3, ICOS, PD-1, leu-12, TCR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, NKG2D, CCR, CCR1, CCR2, CCR4, CCR6 и CCR7.

37. Фармацевтическая композиция, содержащая LNP по любому из пп. 1-36 и фармацевтически приемлемый носитель.

38. Фармацевтическая композиция по п. 37, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит адъювант.

39. Фармацевтическая композиция по п. 37 или 38, где фармацевтическая композиция представляет собой вакцину.

40. Способ доставки по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты и терапевтического агента, в клетку-мишень субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одной LNP по любому из пп. 1-36 и/или фармацевтической композиции по любому из пп. 37-39.

41. Способ по п. 40, где терапевтический агент представляет собой по меньшей мере один агент, выбранный из группы, состоящей из иРНК, миРНК, микроРНК, CRISPR-Cas9, малой молекулы, белка и антитела.

42. Способ по п. 40, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из молекулы ДНК и молекулы РНК.

43. Способ по п. 40, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из кДНК, иРНК, миРНК, миРНК, антагомира, антисмысловой молекулы и таргетированной нуклеиновой кислоты.

44. Способ по п. 40, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует химерный антигенный рецептор (CAR).

45. Способ по п. 44, где CAR специфичен к связыванию с поверхностным антигеном патогенной клетки или опухолевой клетки.

46. Способ по любому из пп. 40-45, где клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из стволовой клетки, моноклеарной клетки периферической крови и иммунной клетки.

47. Способ по п. 45 или 46, где CAR содержит домен, таргетирующий клетку, специфичный для связывания с Т-клеткой.

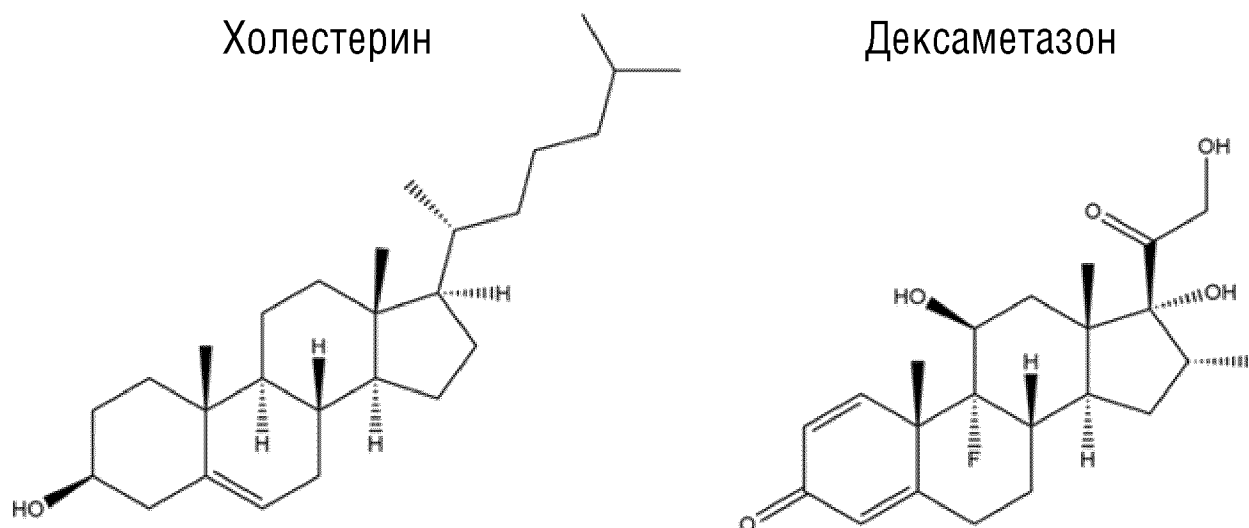
48. Способ по п. 47, где домен, таргетирующий клетку, специфичен для связывания по меньшей мере с одним, выбранным из группы, состоящей из CD1, CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD16, CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD38, CD39, CD40L, CD44, CD45, CD62L, CD69, CD73, CD80, CD83, CD86, CD95, CD103, CD119, CD126, CD150, CD153, CD154, CD161, CD183, CD223, CD254, CD275, CD45RA, CXCR3, CXCR5, FasL, IL18R1, CTLA-4, OX40, GITR, LAG3, ICOS, PD-1, leu-12, TCR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, NKG2D, CCR, CCR1, CCR2, CCR4, CCR6 и CCR7.

49. Способ по любому из пп. 40-48, где LNP или ее фармацевтическая композиция дополнительно содержит адъювант.

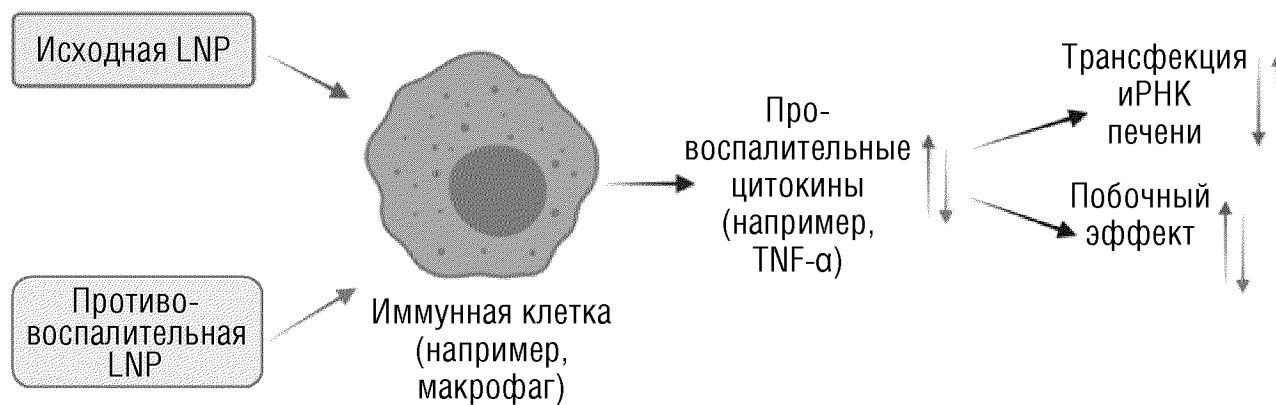
50. Способ по любому из пп. 40-49, где молекула нуклеиновой кислоты и/или терапевтический агент по меньшей мере частично инкапсулирован в LNP.

51. Способ по любому из пп. 40-50, где способ лечит, предотвращает и/или улучшает состояние по меньшей мере одного заболевания, выбранного из группы, состоящей из вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, паразитарной инфекции, рака или заболевания или нарушения, ассоциированного с раком.

ФИГ.1А



ФИГ.1В

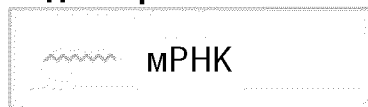


ФИГ.2

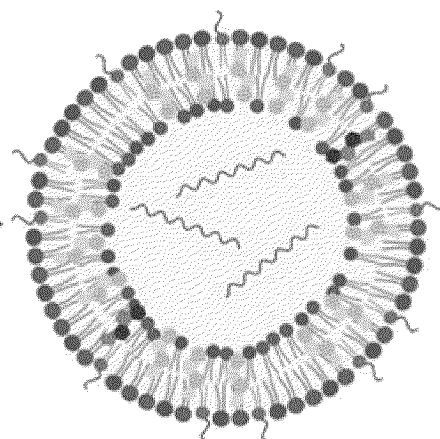
Органическая фаза



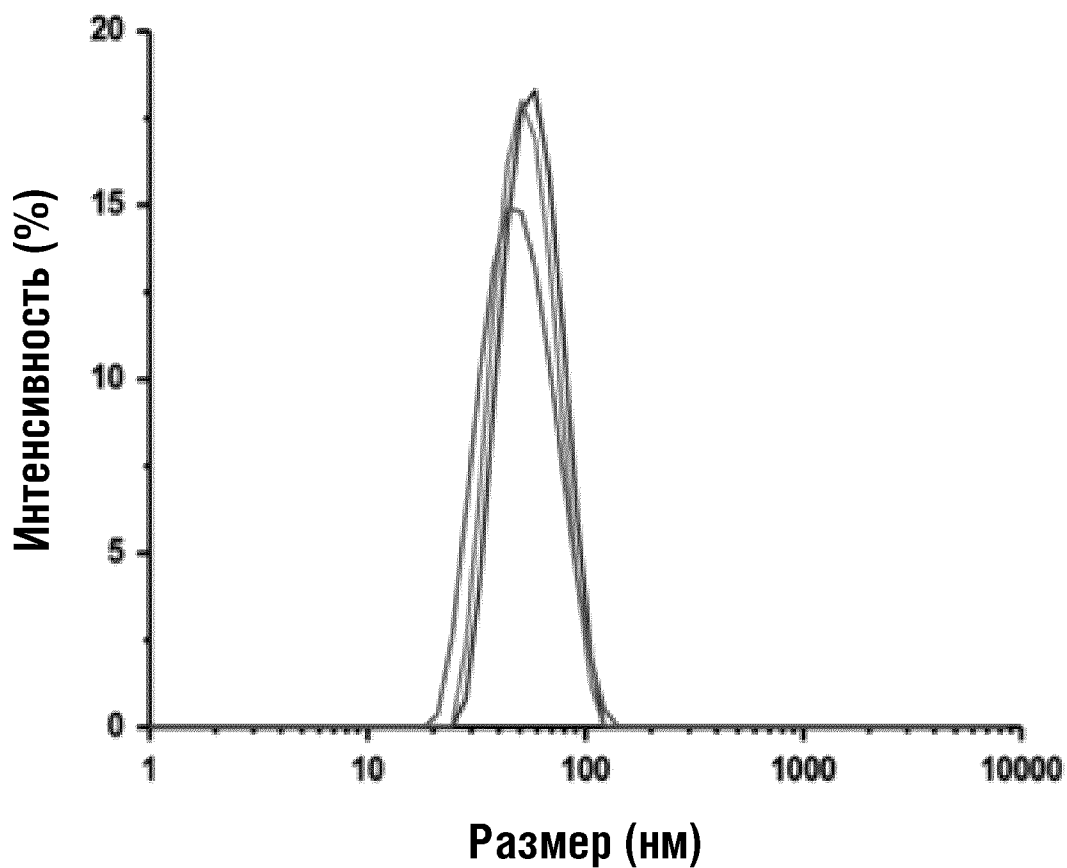
Водная фаза

Микро-
флюидное
смешивание

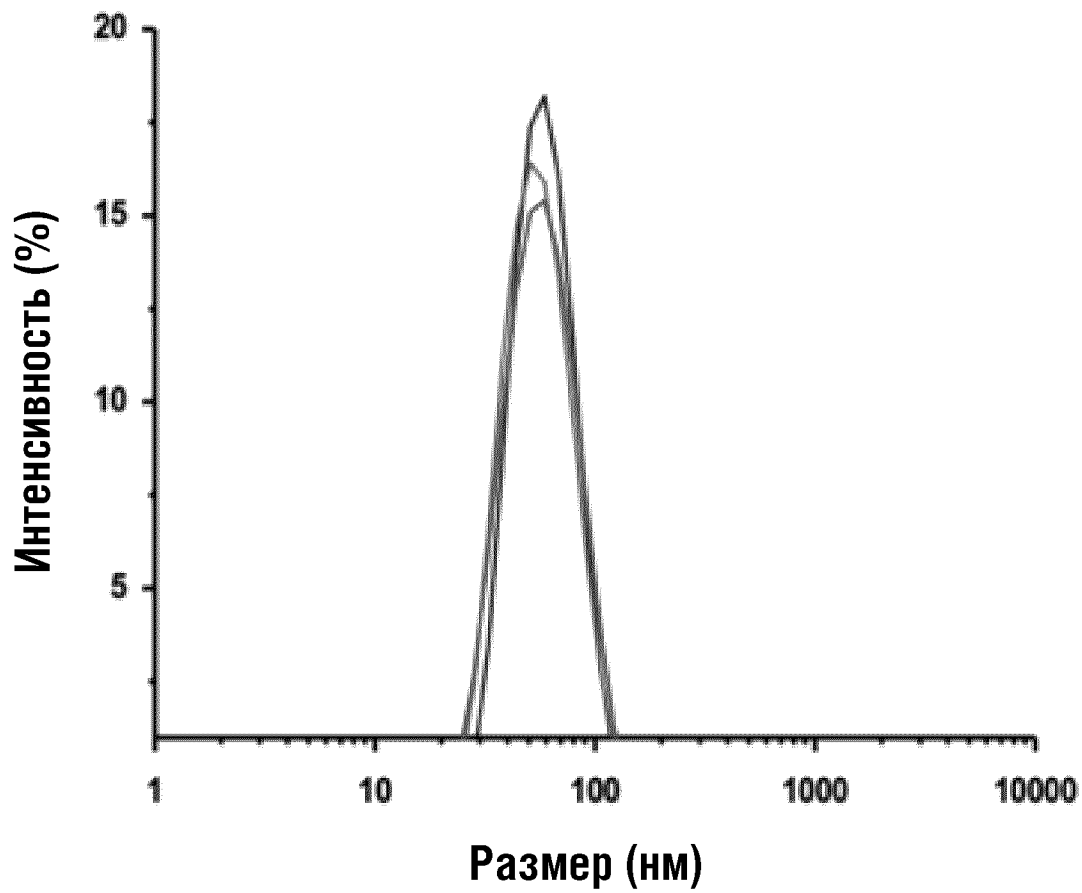
LNP



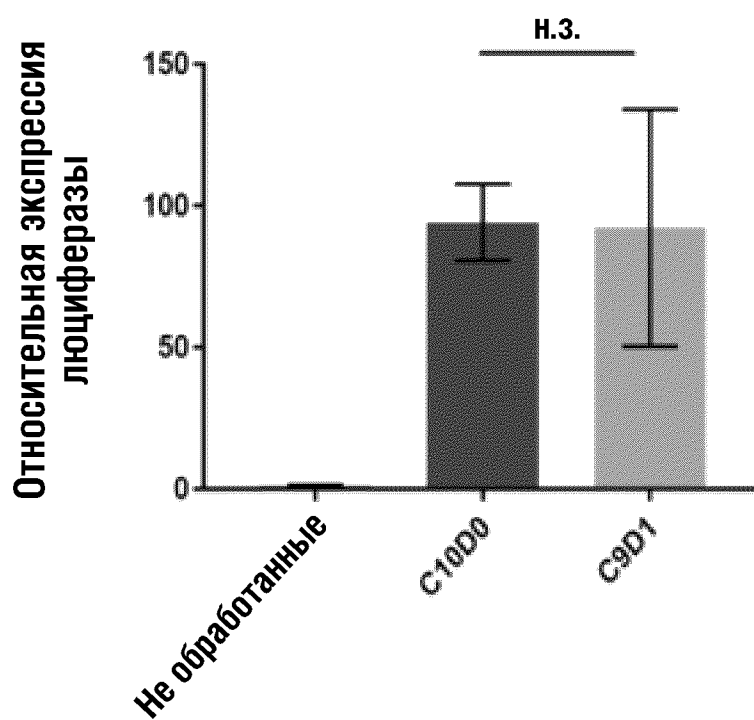
ФИГ.3А



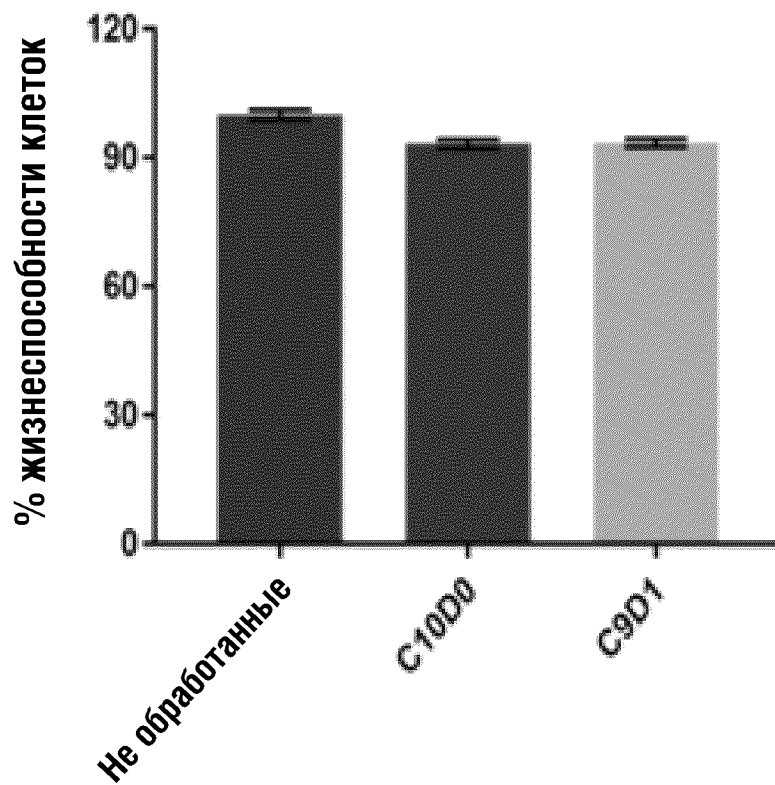
ФИГ.3В



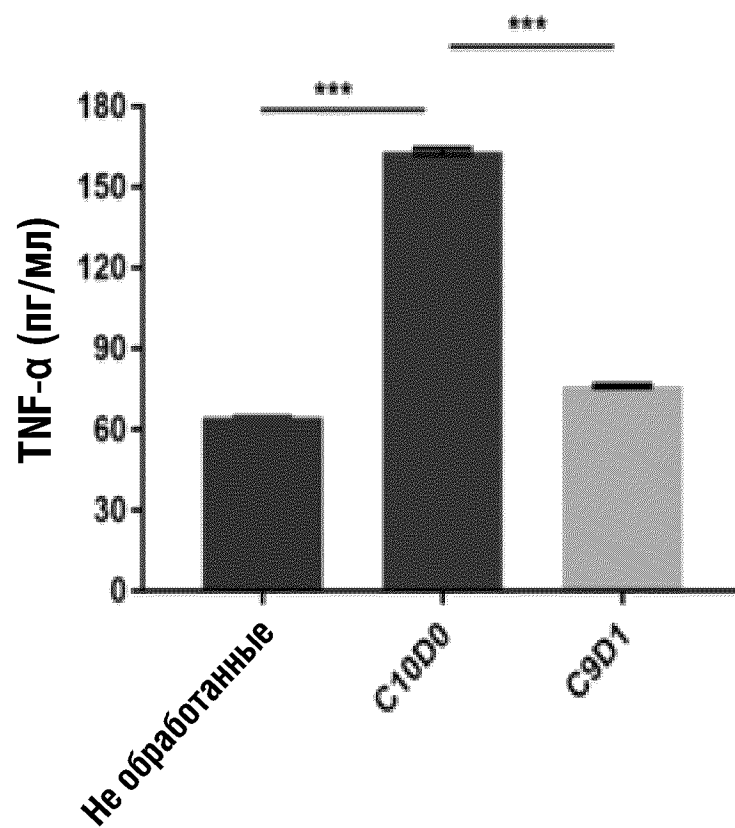
ФИГ.4А



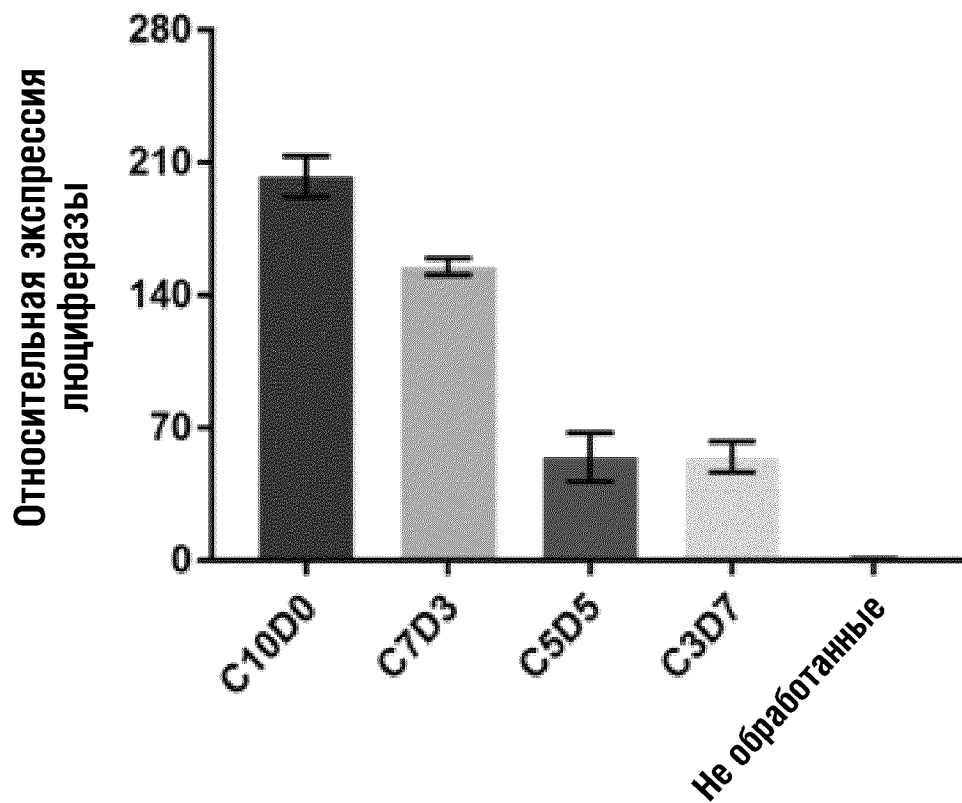
ФИГ.4В



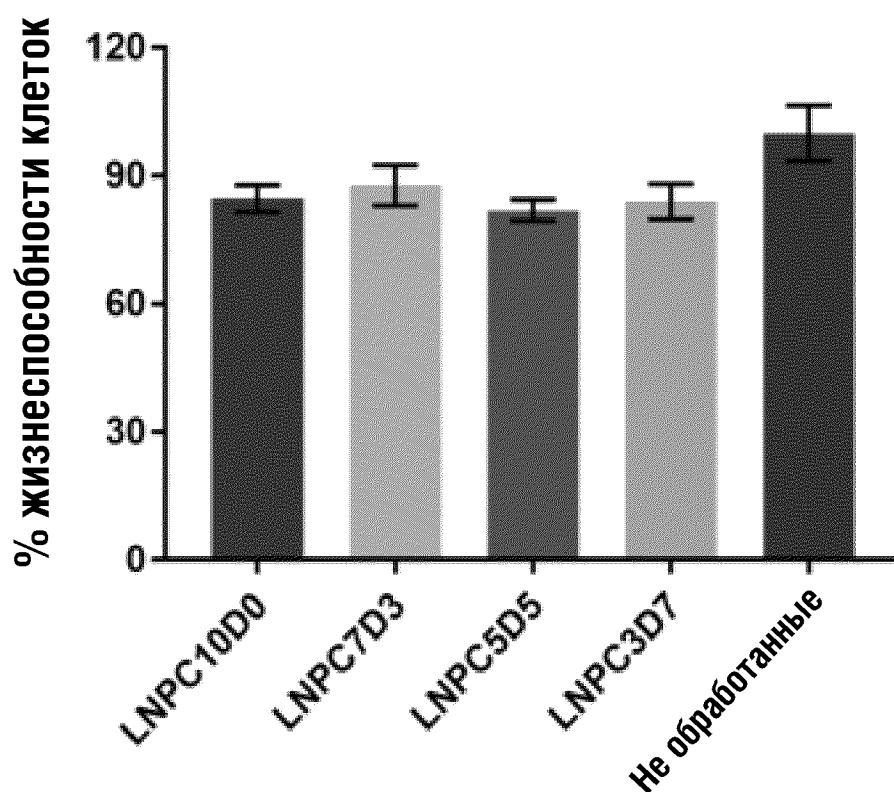
ФИГ.4С



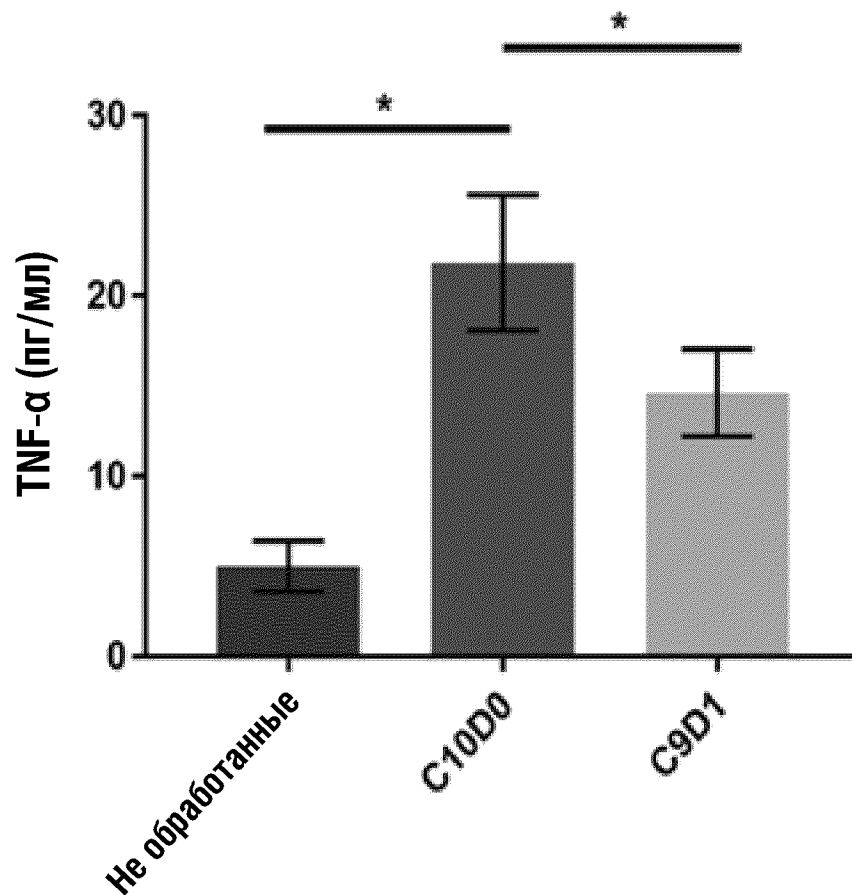
ФИГ.5А



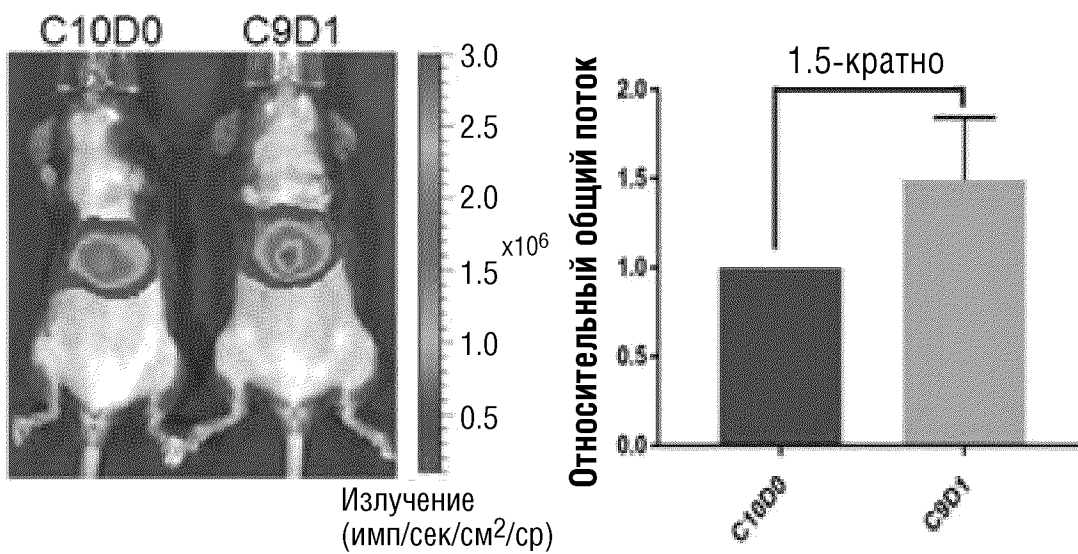
ФИГ.5В



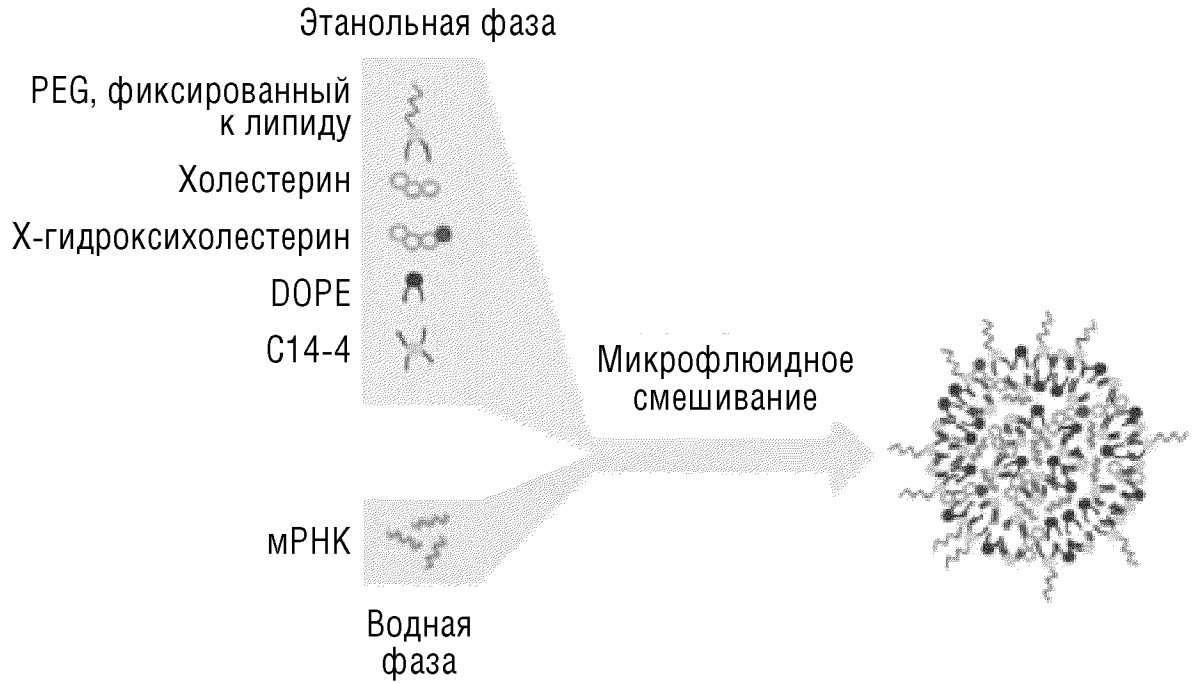
ФИГ.6А



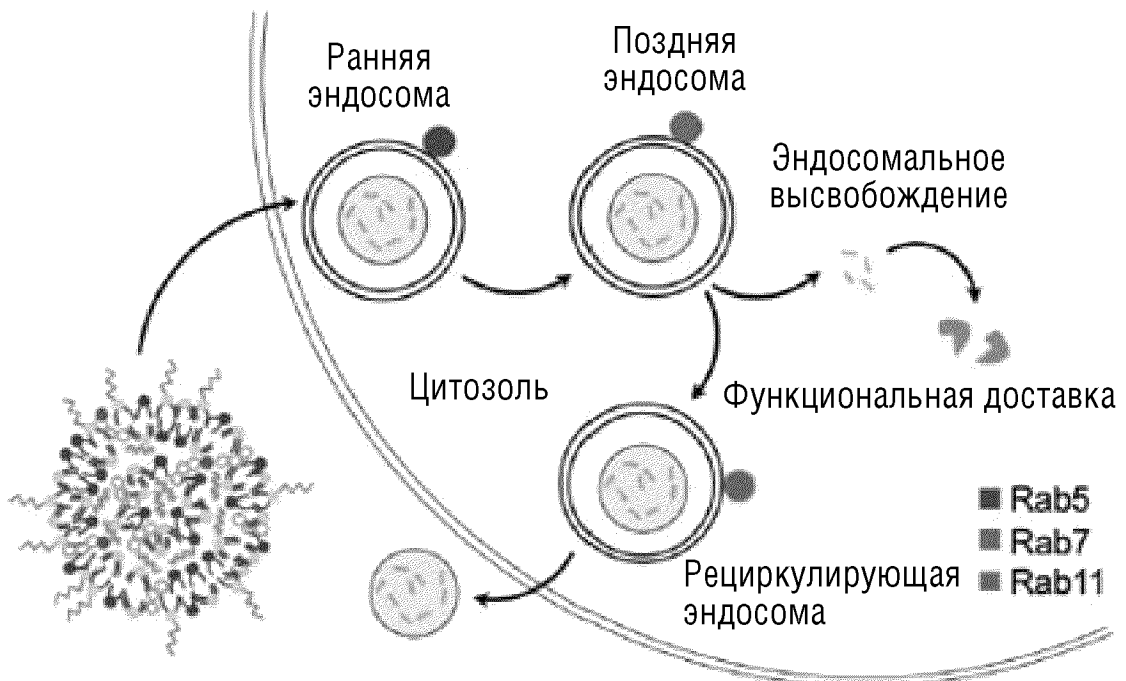
ФИГ.6В



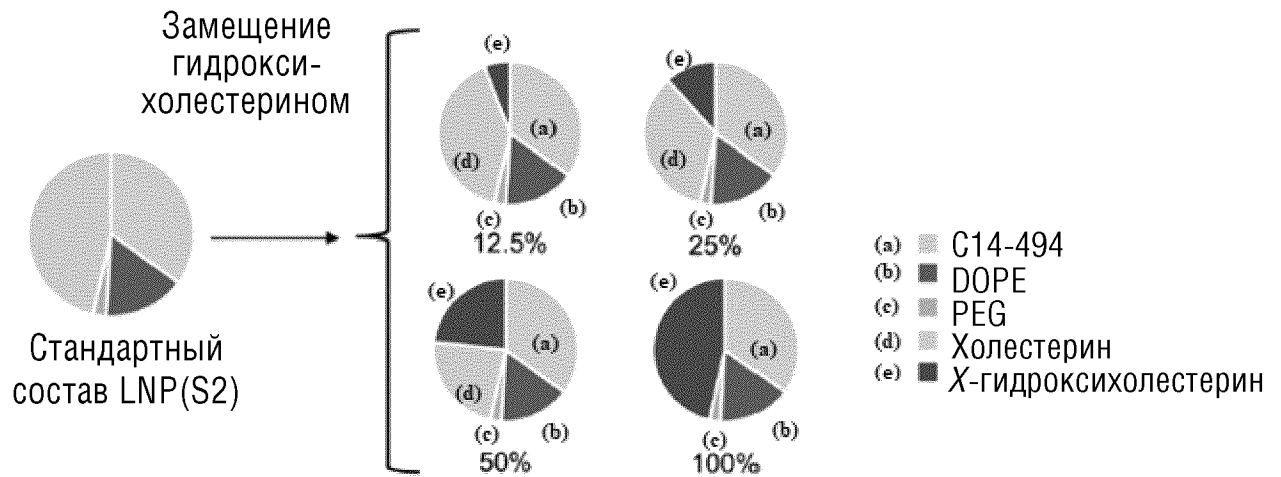
ФИГ.7А



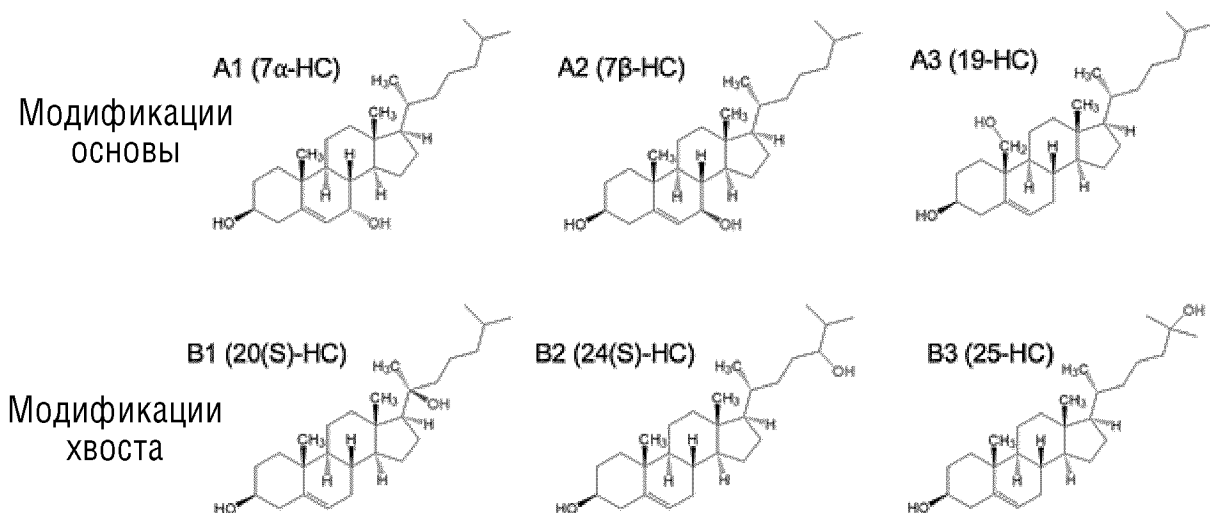
ФИГ.7В



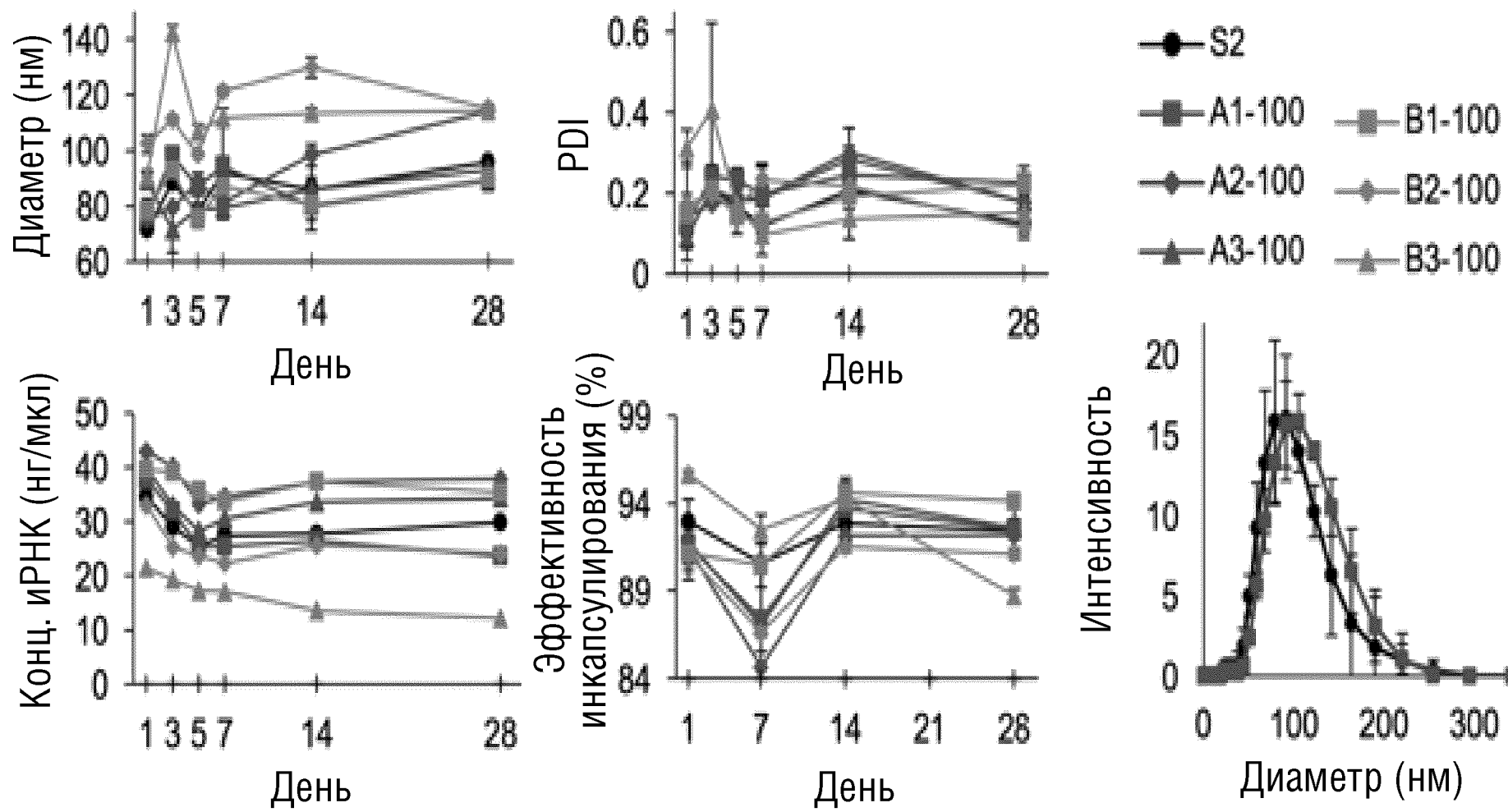
ФИГ.7С



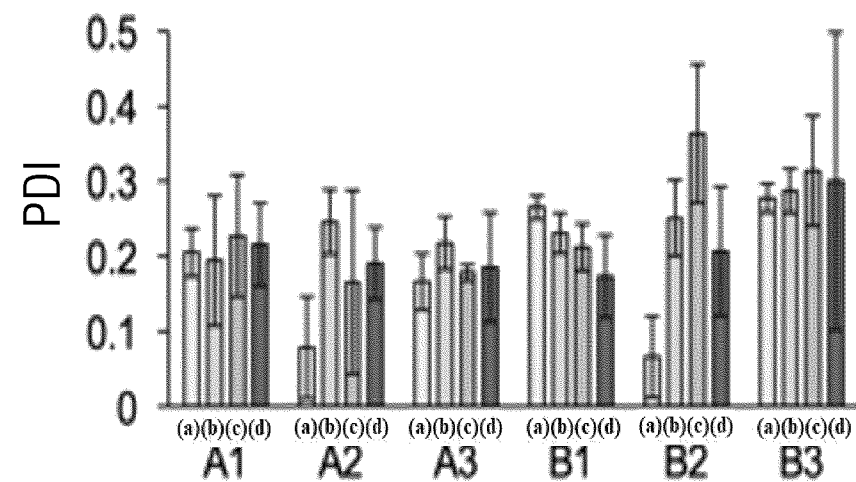
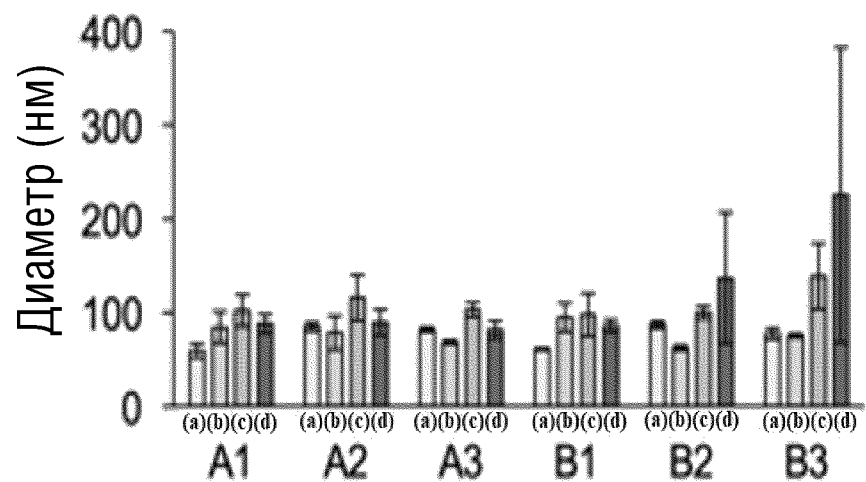
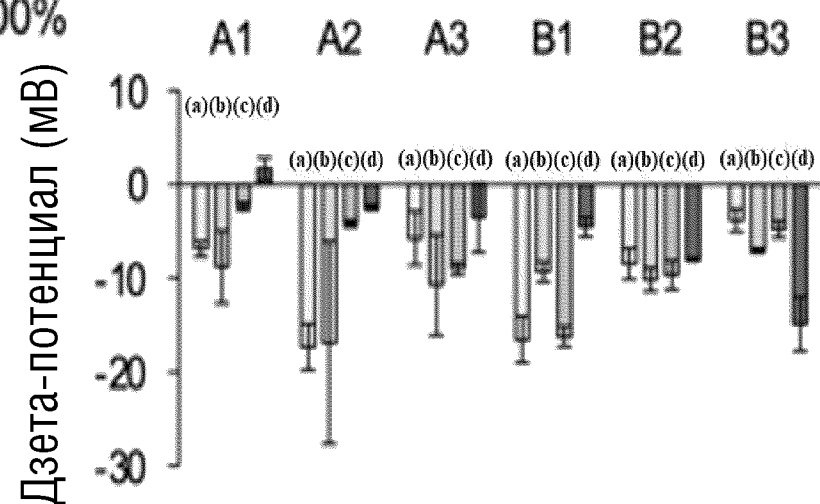
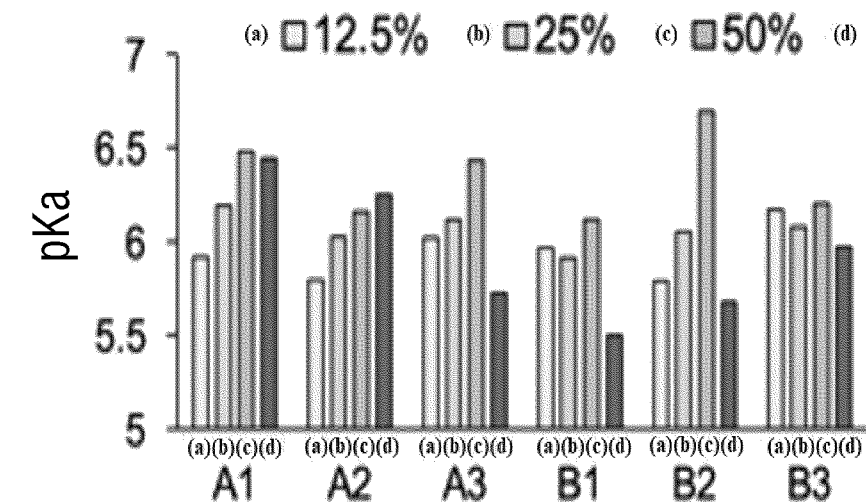
ФИГ.8А



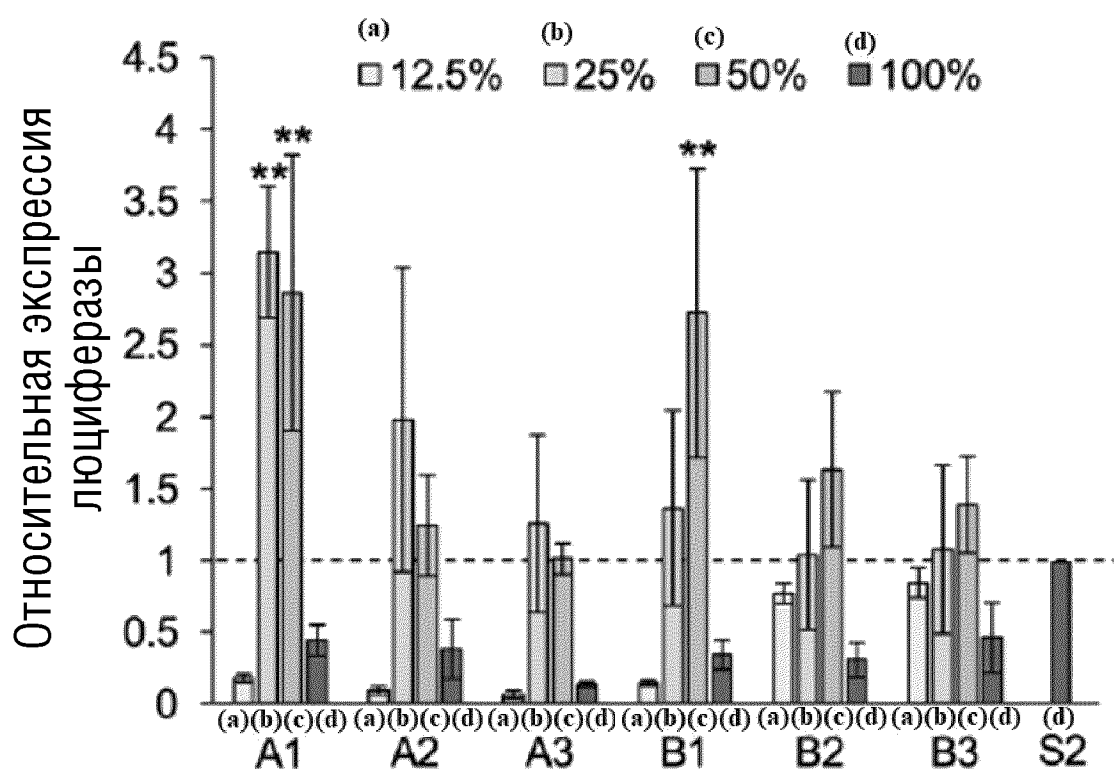
ФИГ.8В



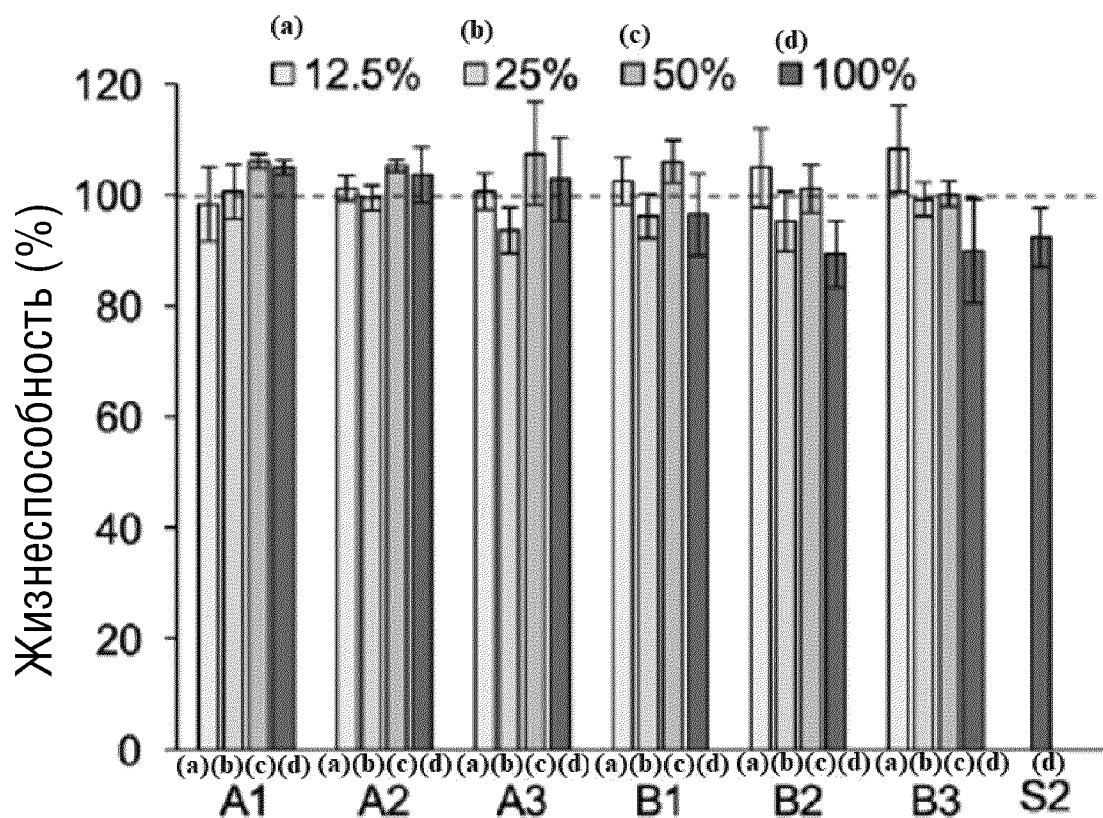
ФИГ.8С



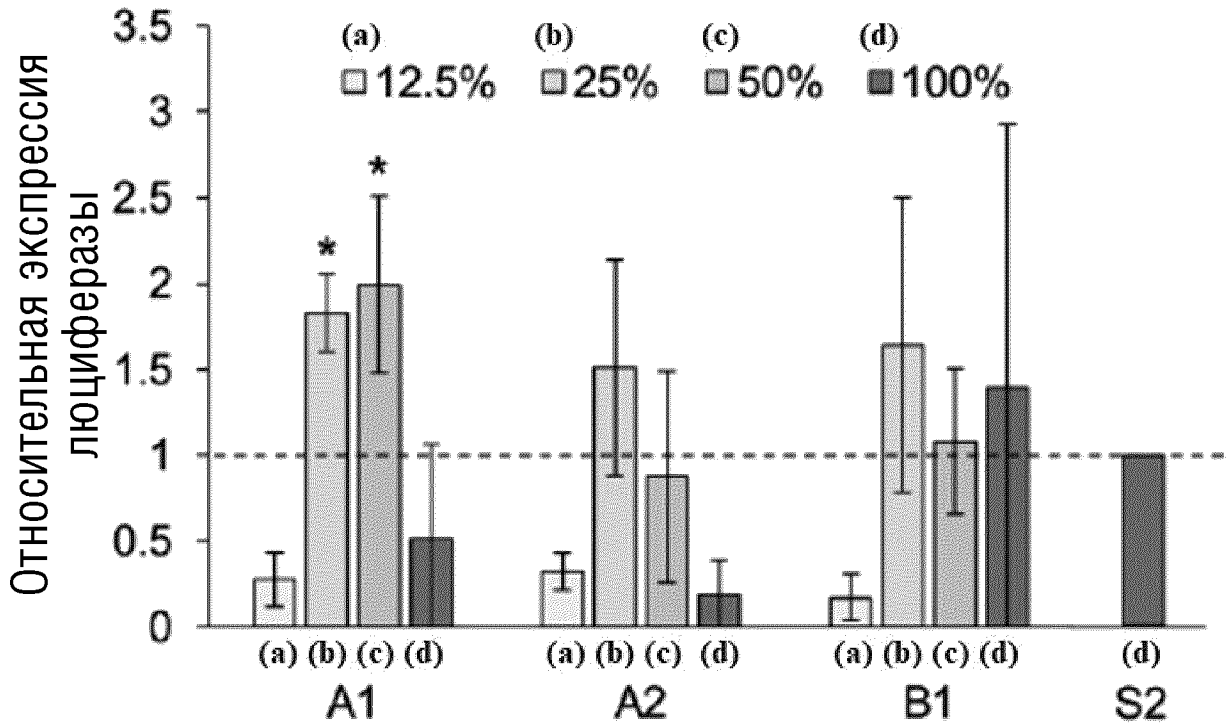
ФИГ.9А



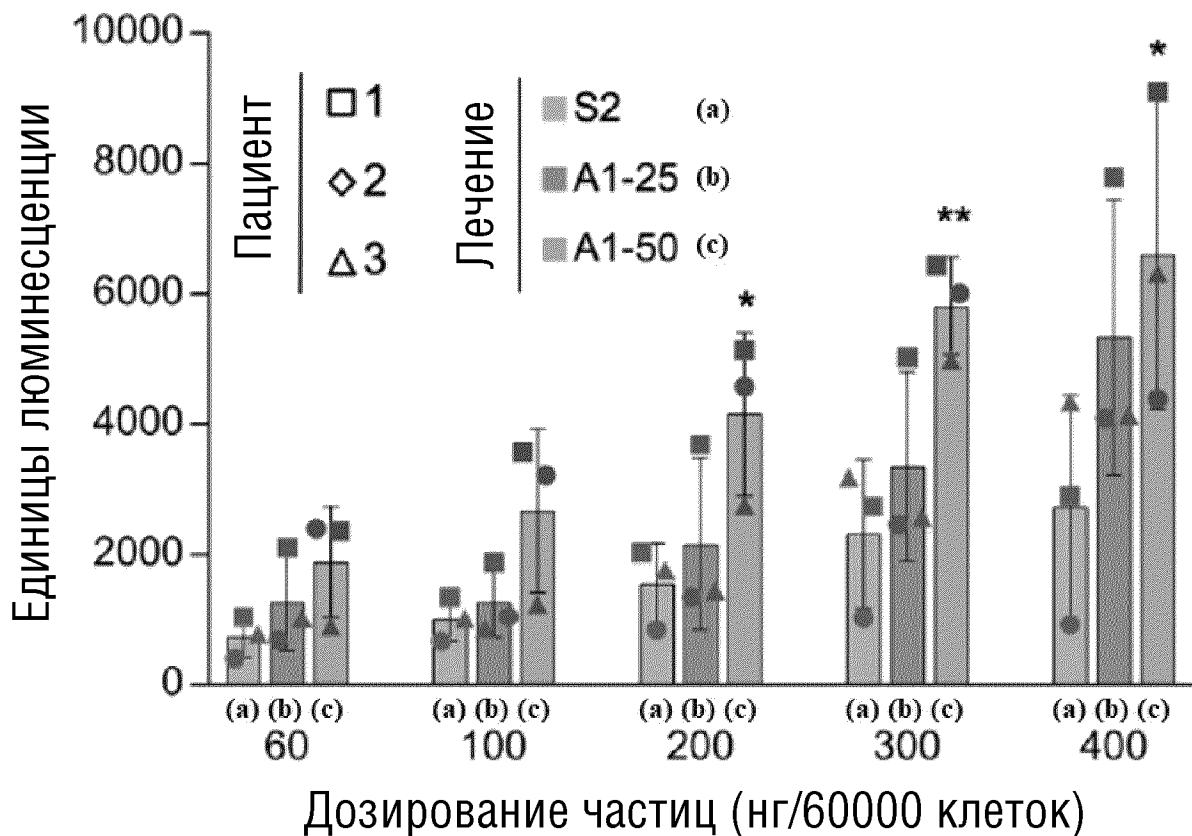
ФИГ.9В



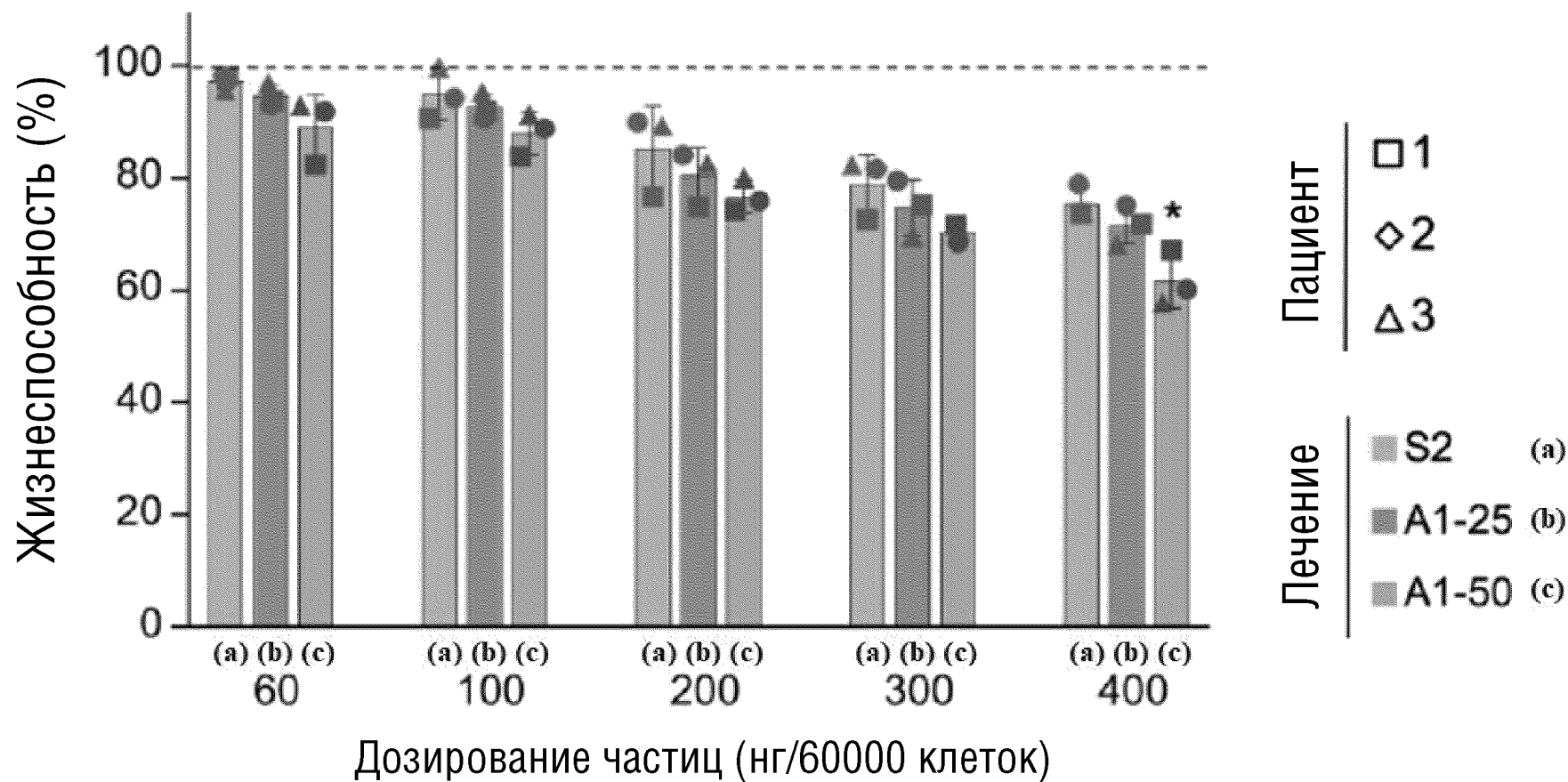
ФИГ.10А



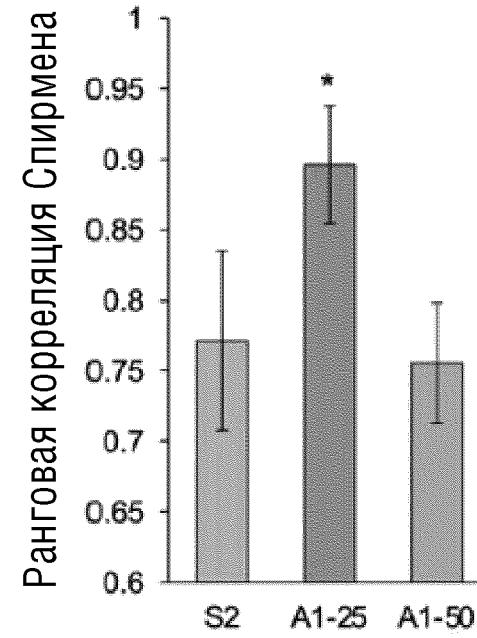
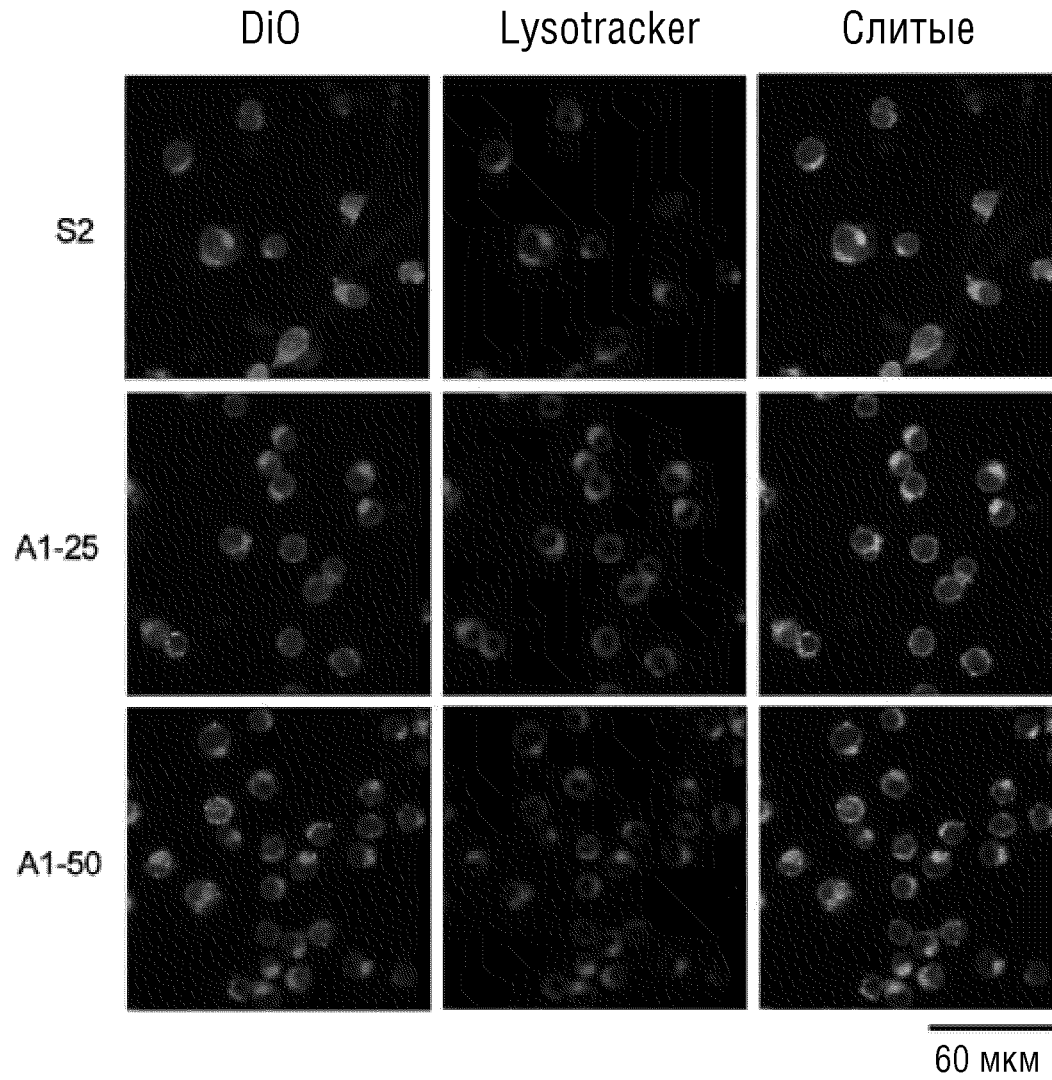
ФИГ.10В



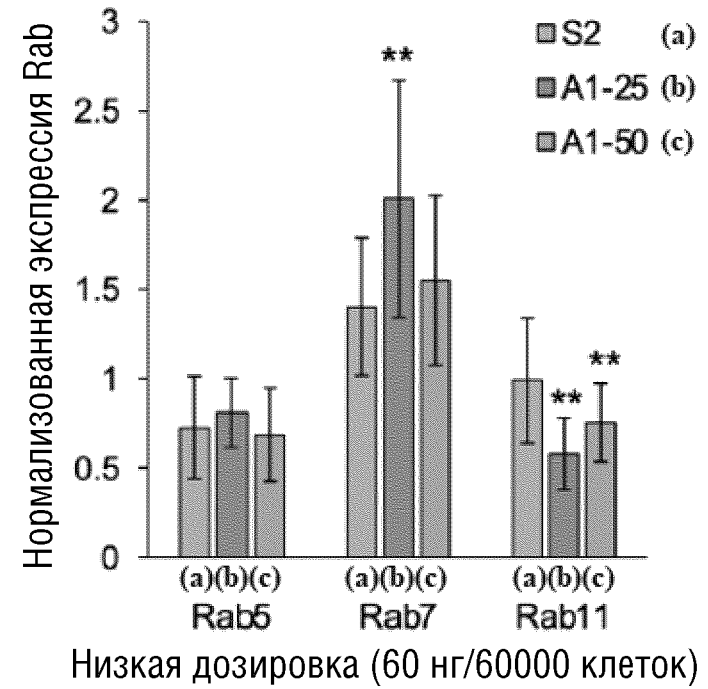
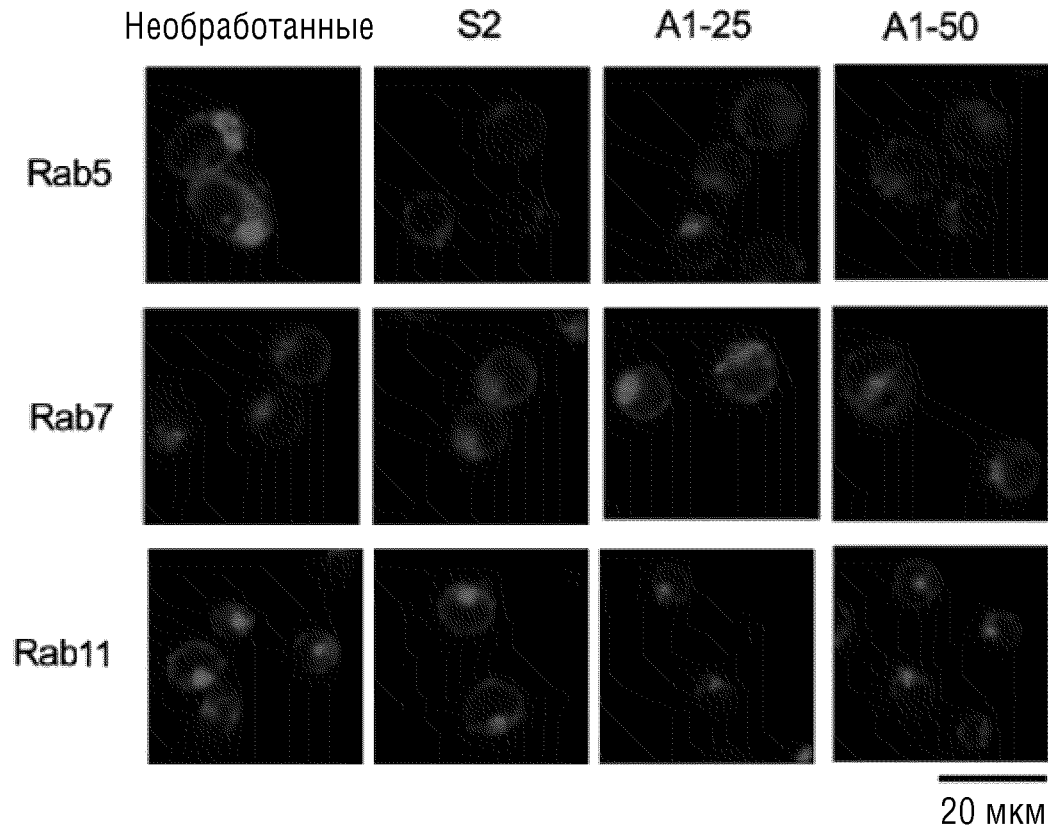
ФИГ.10С



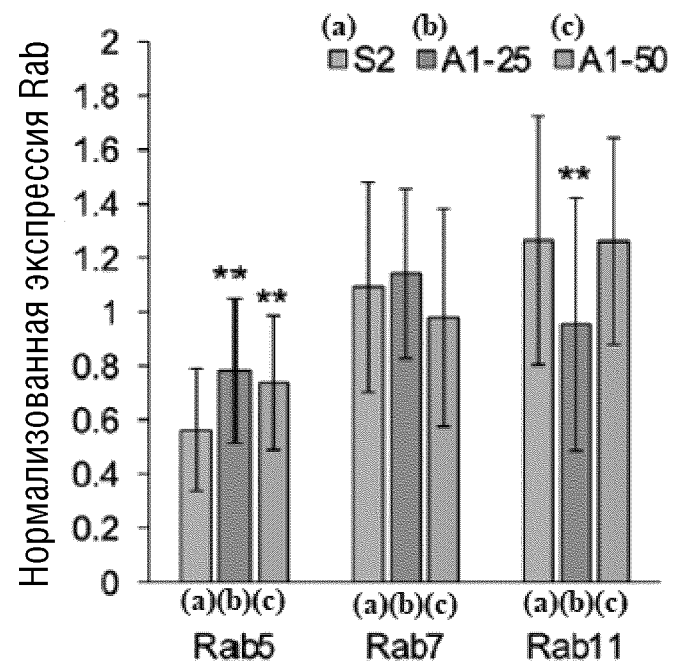
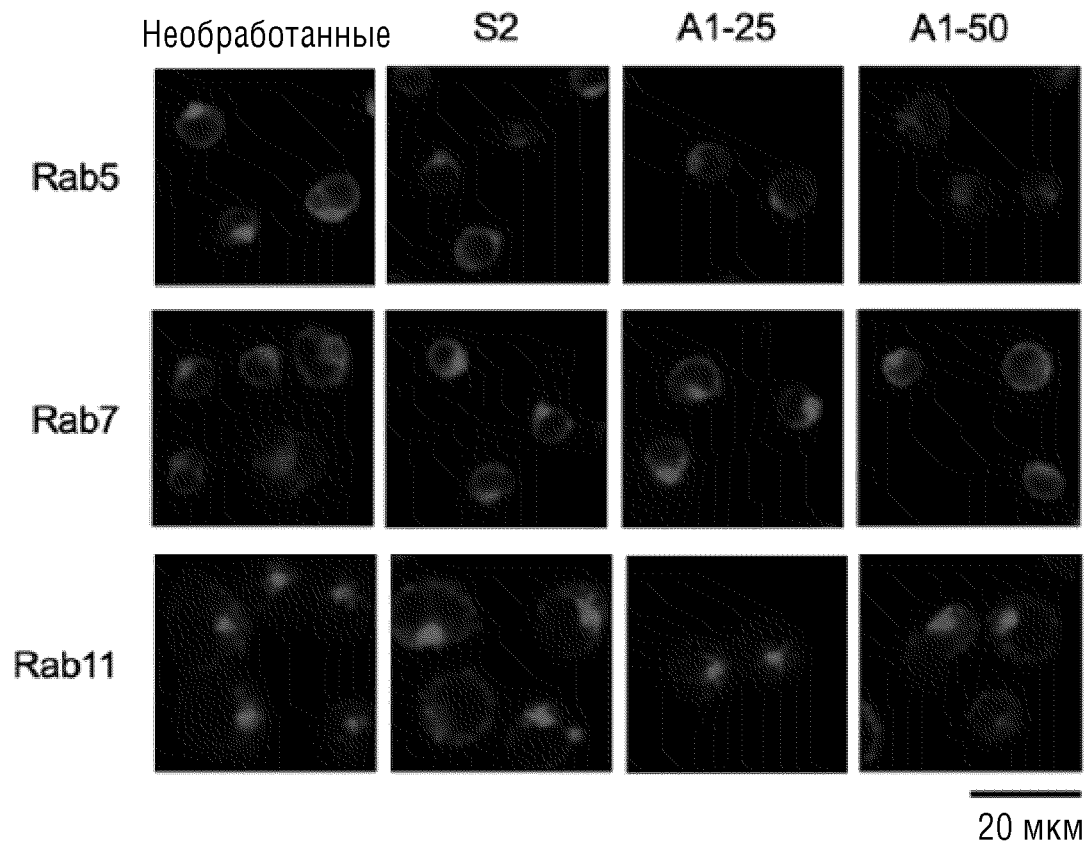
ФИГ.11



ФИГ.12А

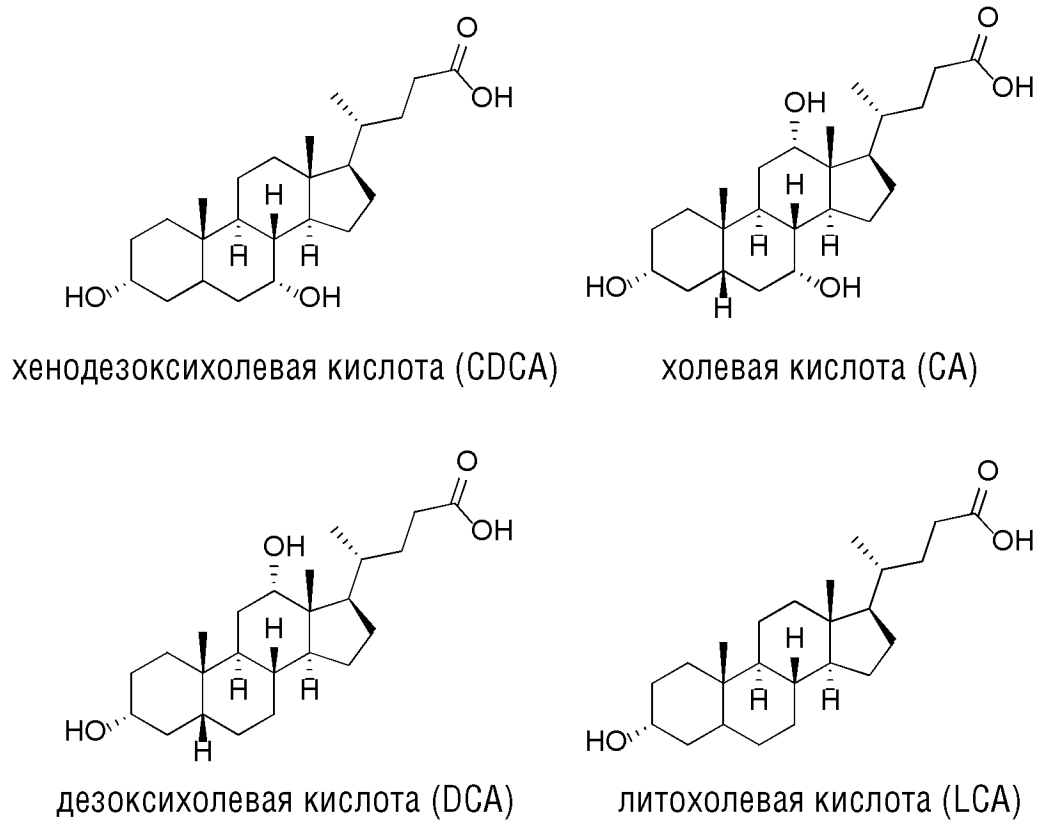


ФИГ.12В

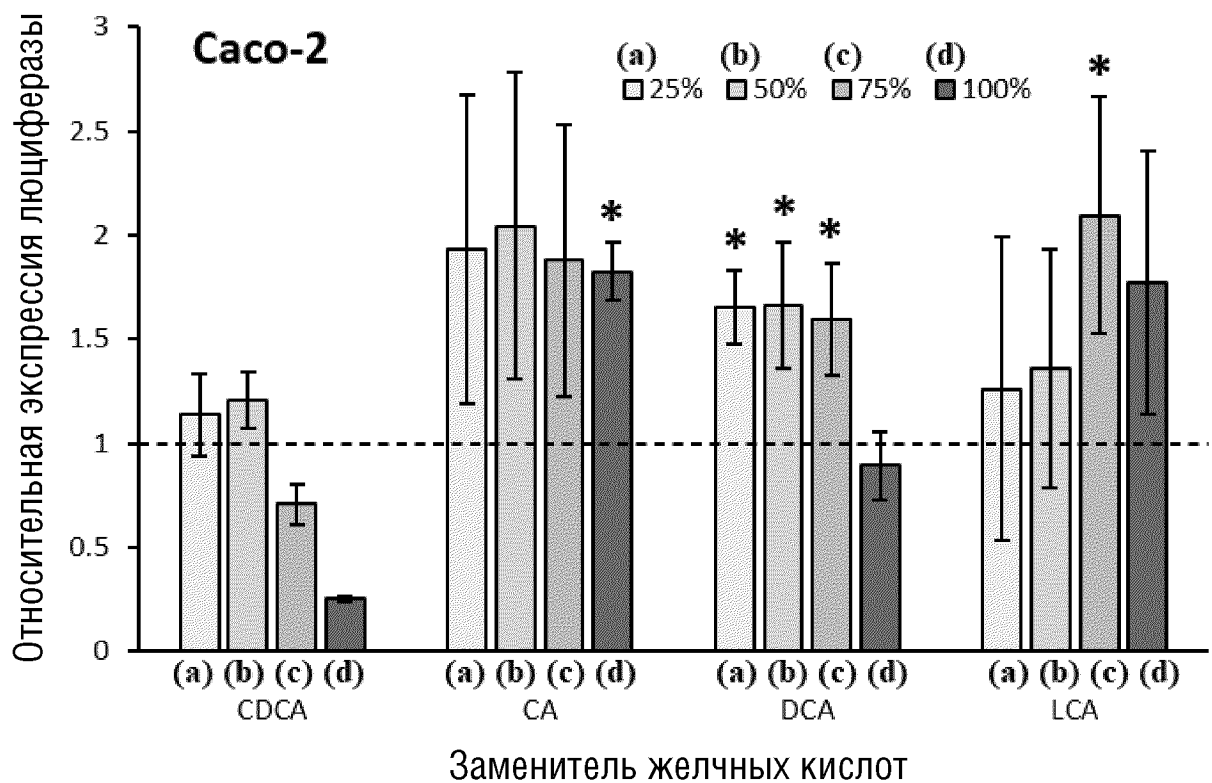


Высокая дозировка (150 нг/60000 клеток)

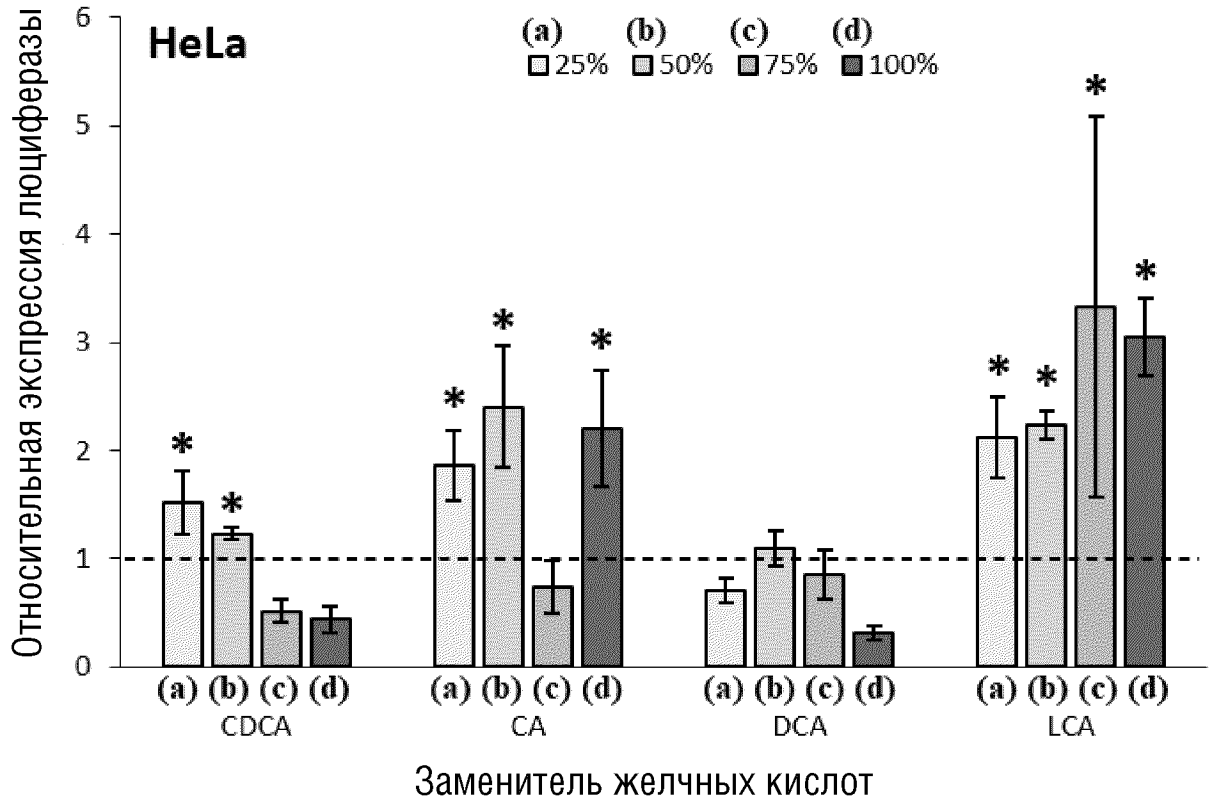
ФИГ.13



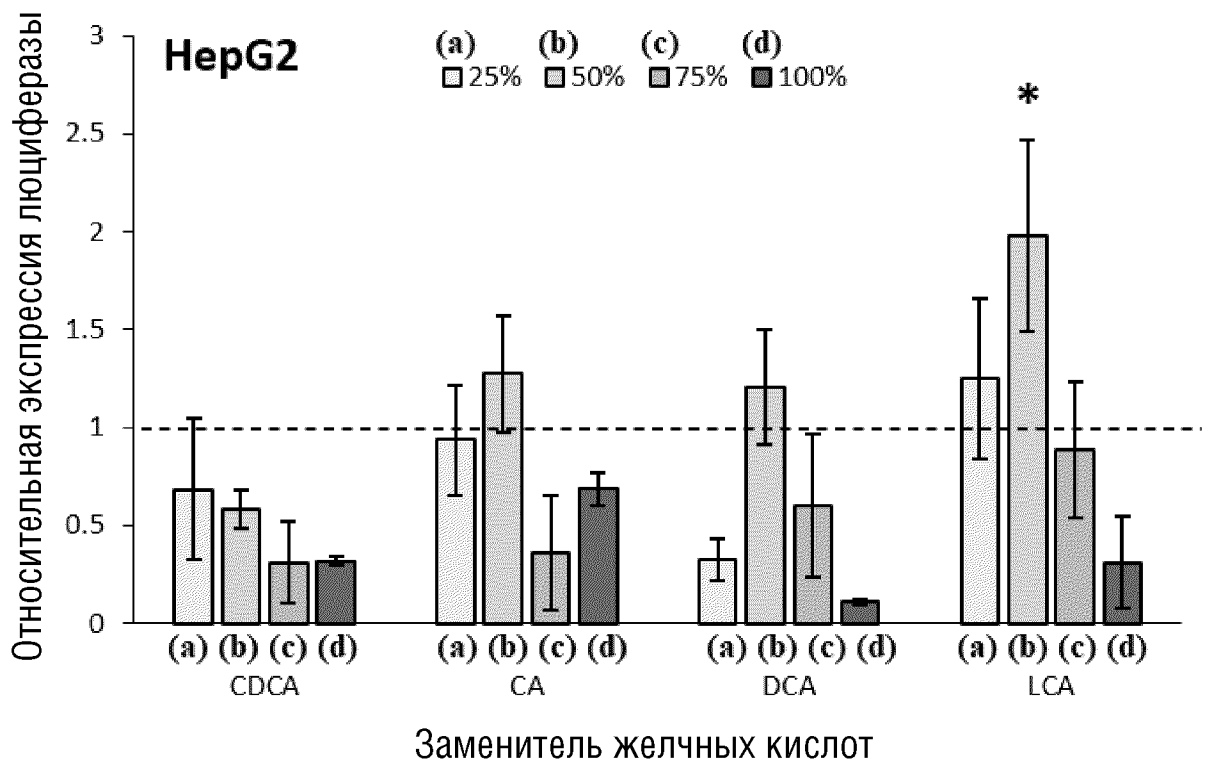
ФИГ.14А



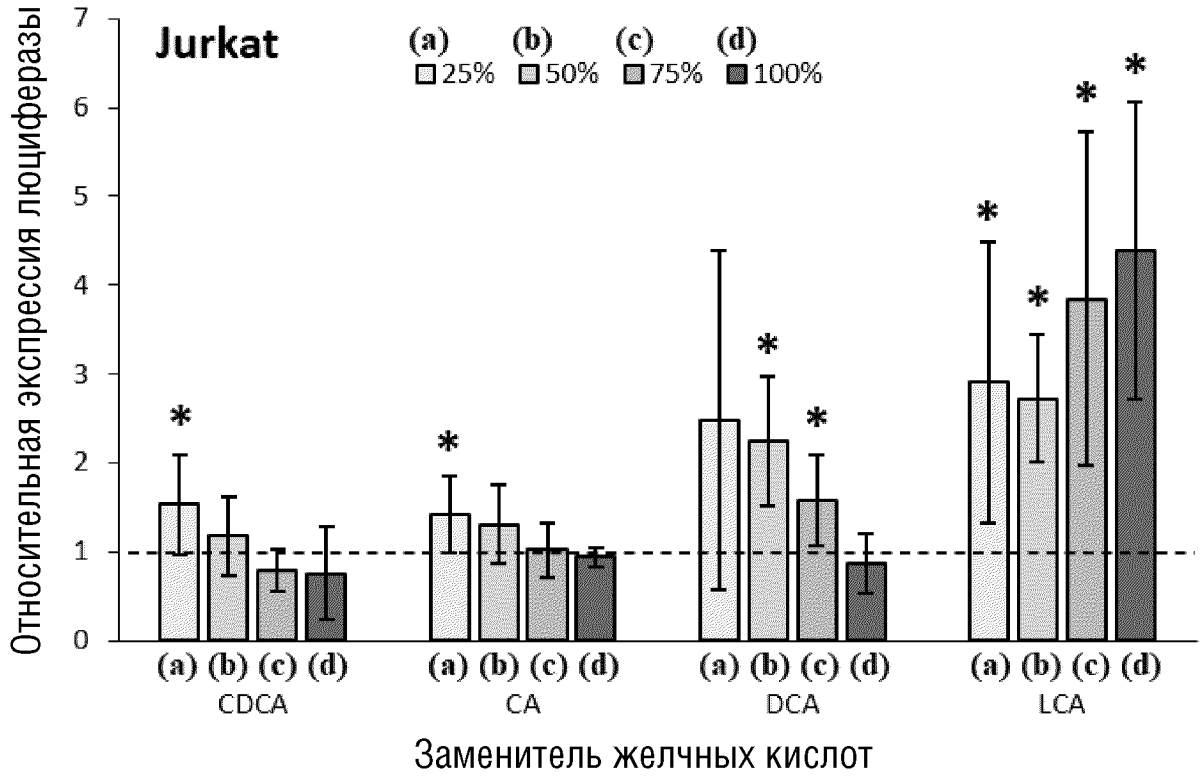
ФИГ.14В



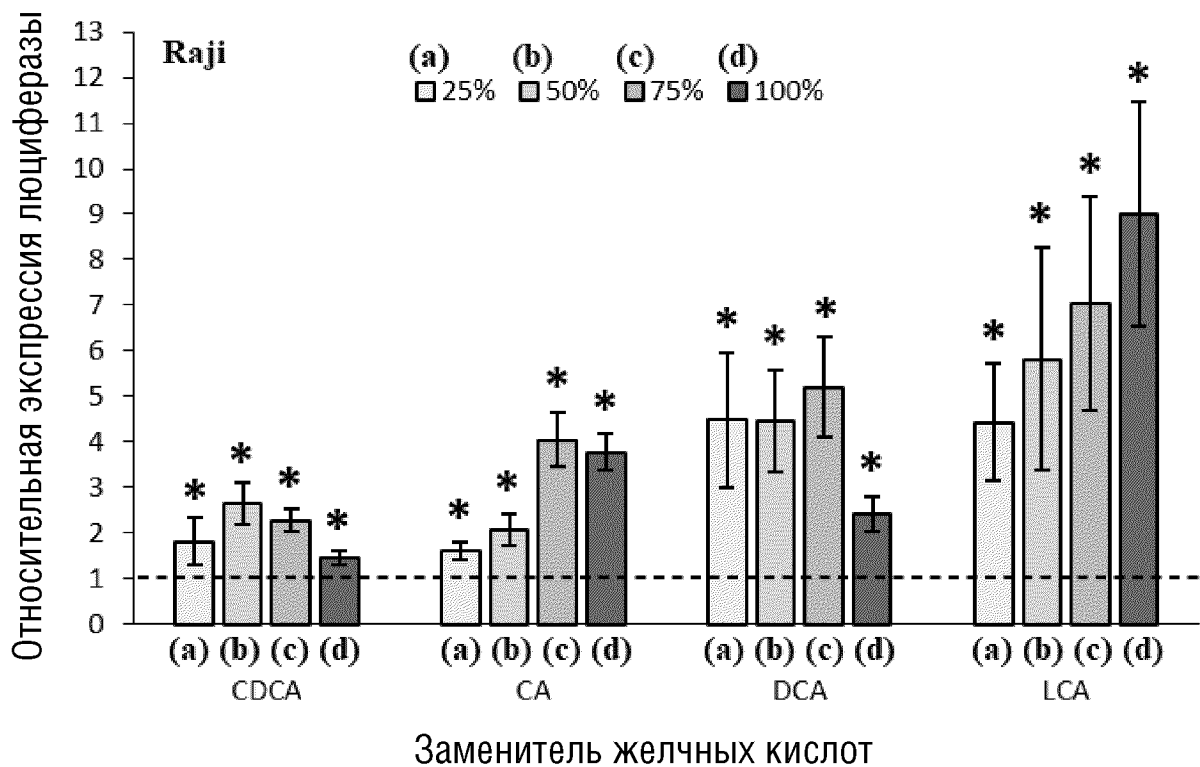
ФИГ.14С



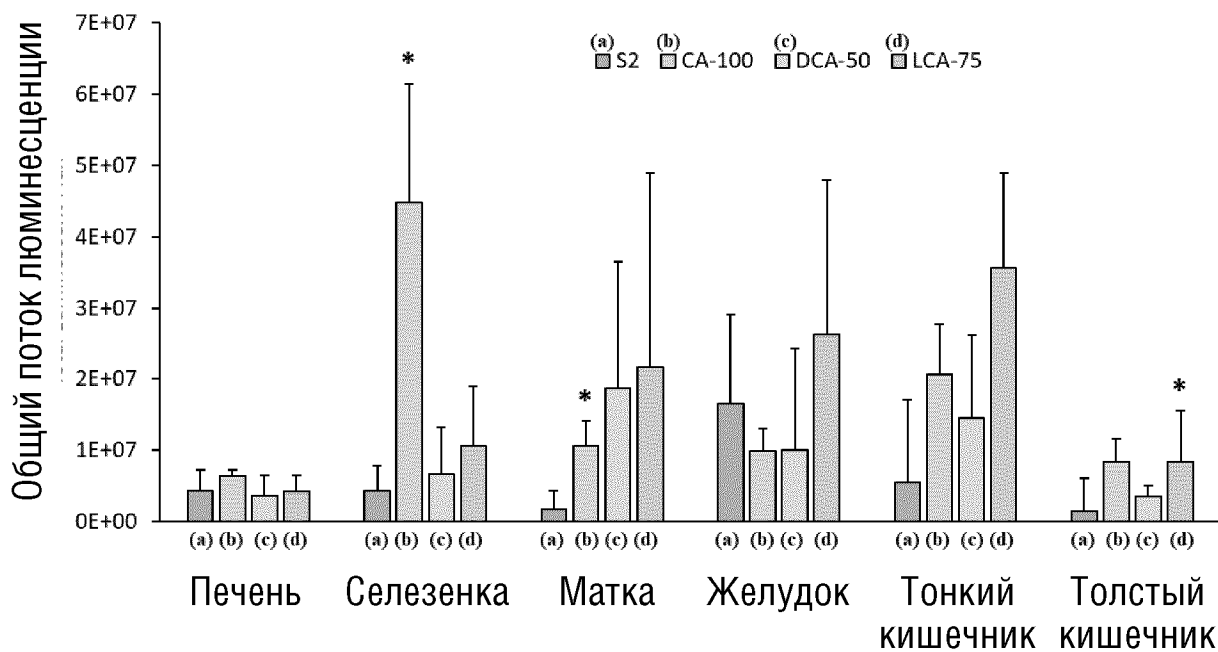
ФИГ.14D



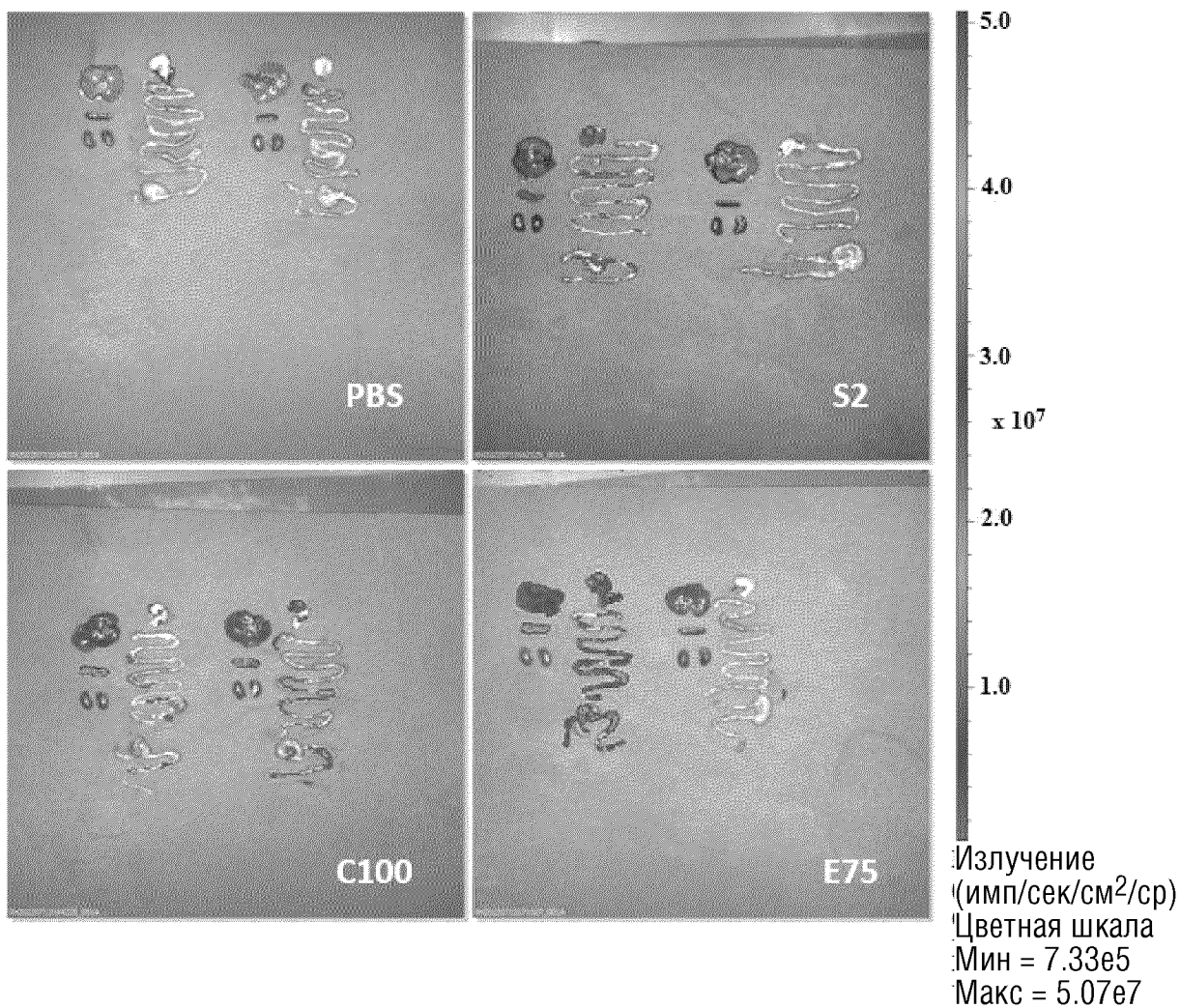
ФИГ.14E



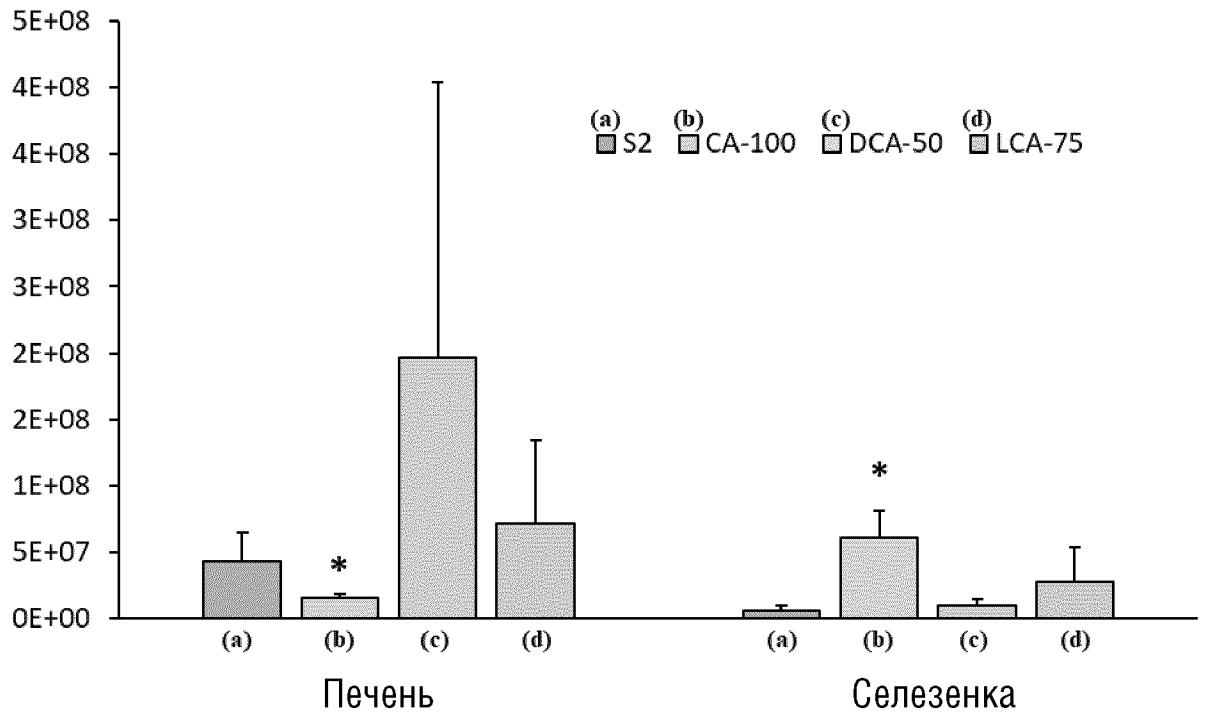
ФИГ.15А



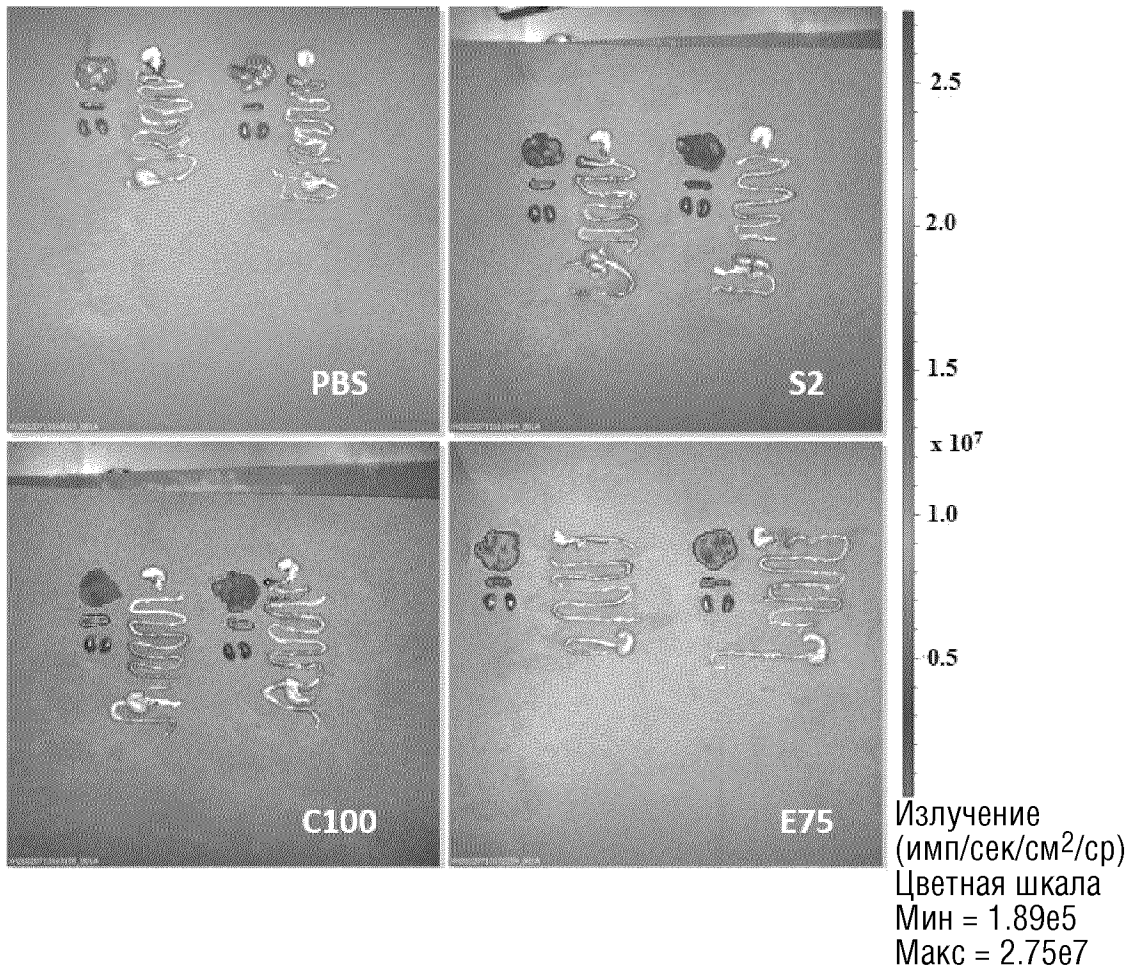
ФИГ.15В



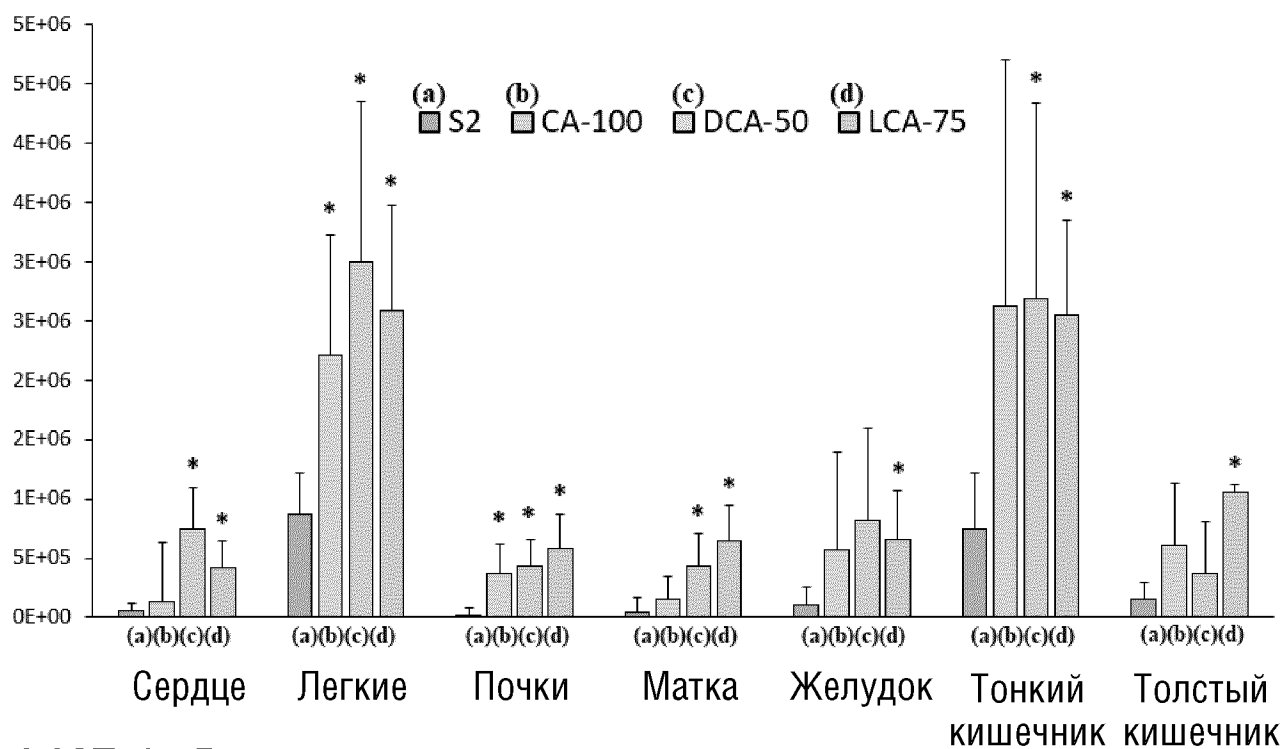
ФИГ.16А



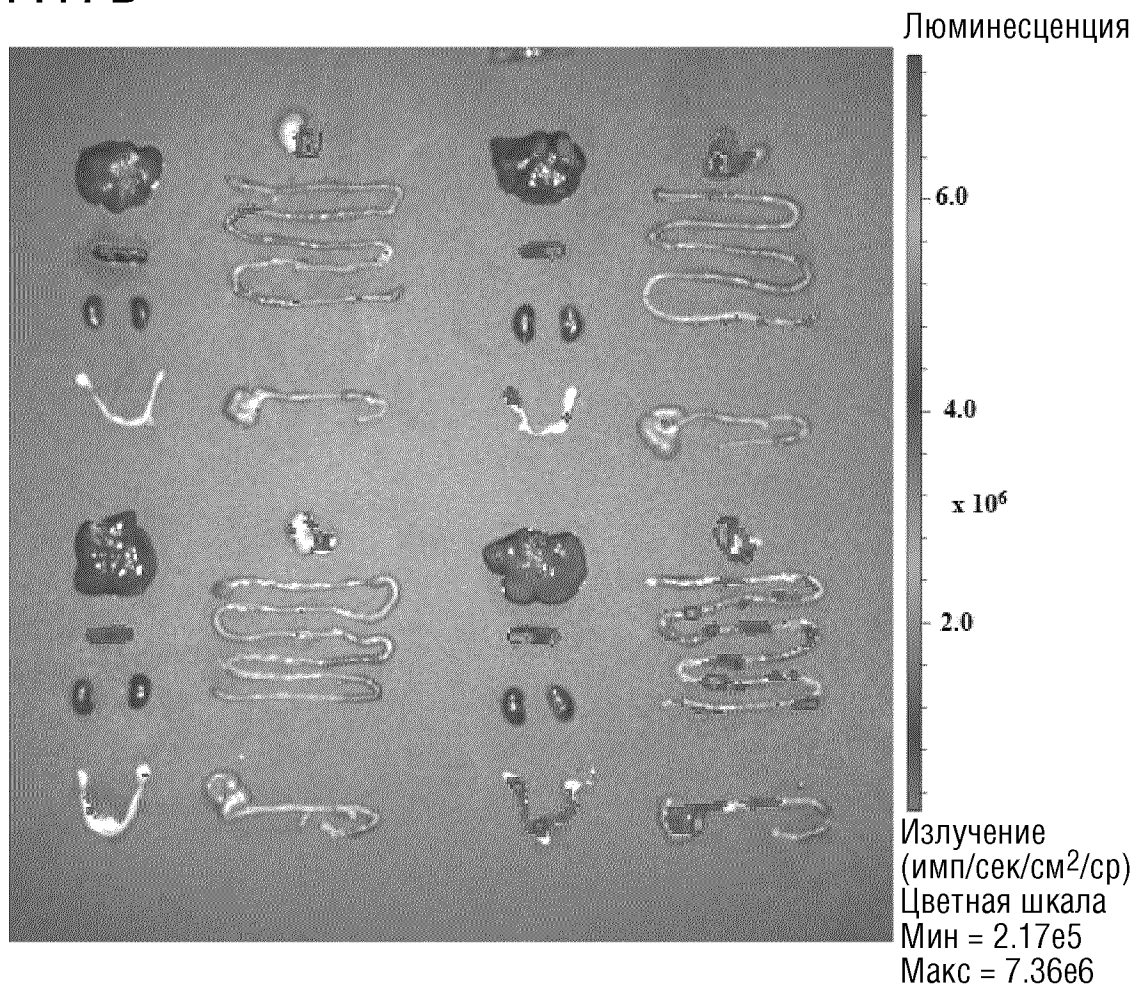
ФИГ.16В



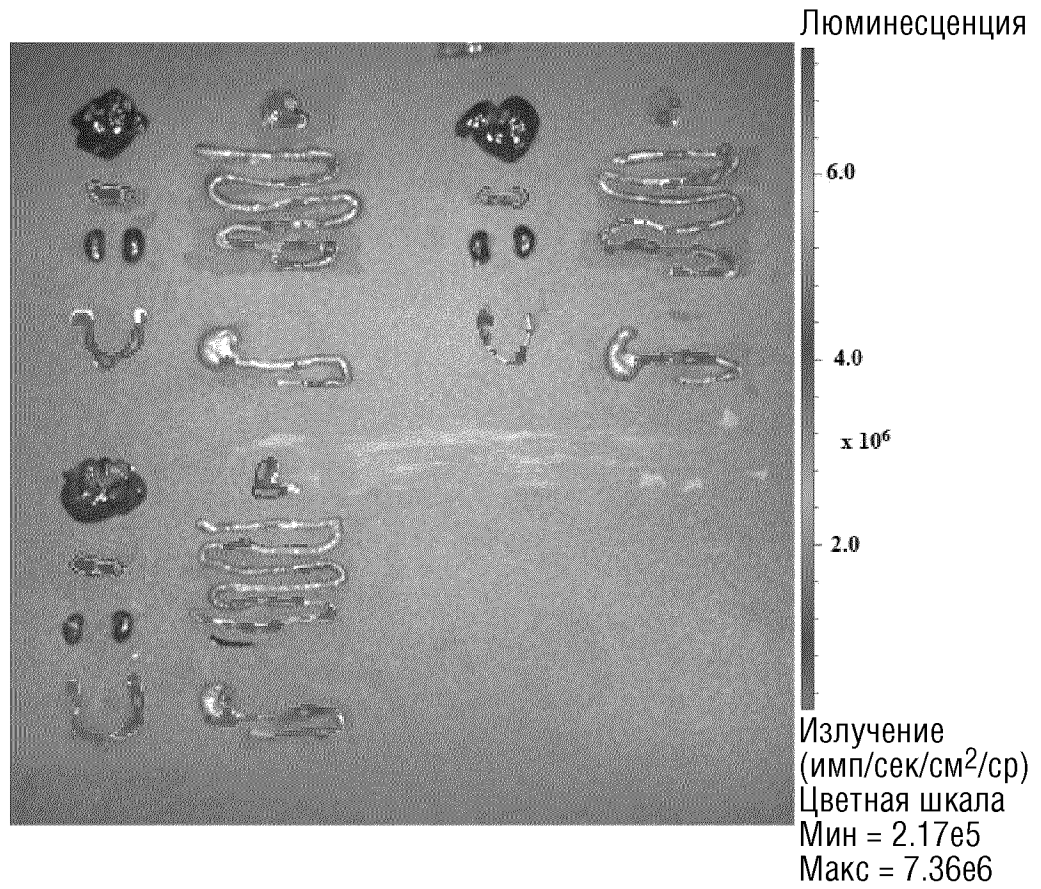
ФИГ.17А



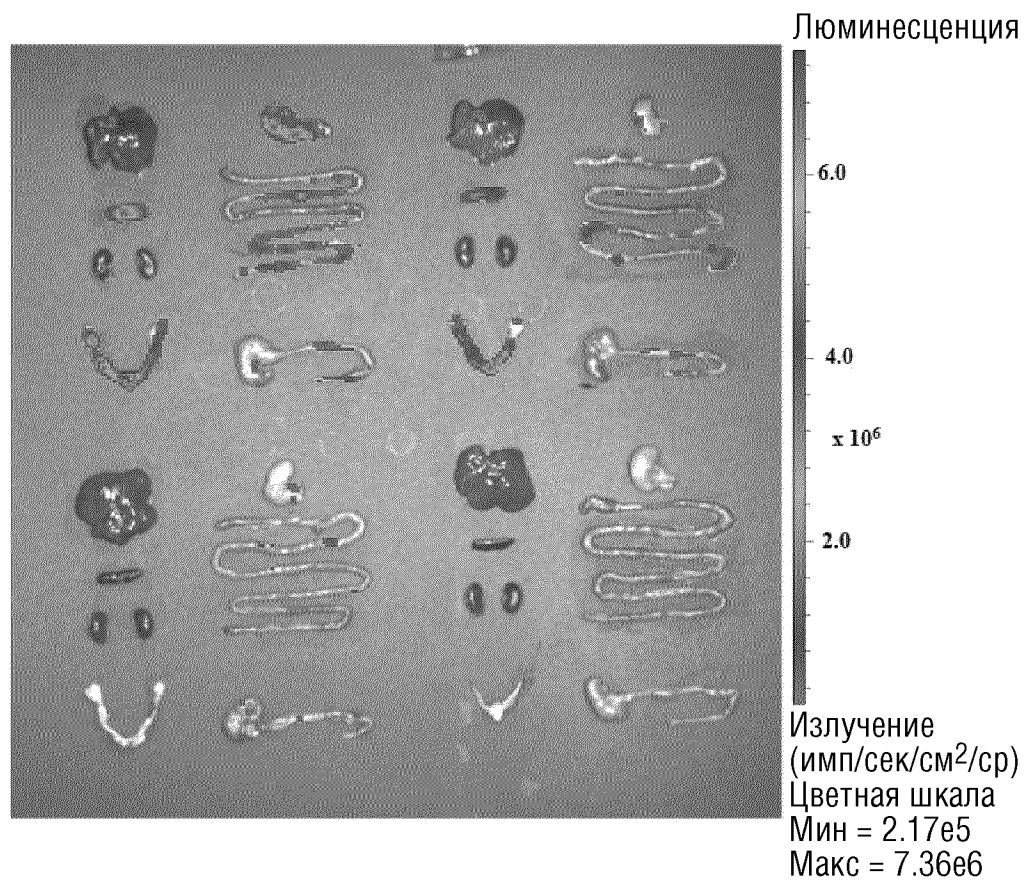
ФИГ.17В



ФИГ.17С



ФИГ.17D



ФИГ.17Е

