(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190916 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.09

(22) Дата подачи заявки
2019.10.02

(51) Int. Cl. ***C07C 219/06*** (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07C 219/16 (2006.01)
C07C 229/12 (2006.01)
C07C 271/12 (2006.01)
C07C 275/14 (2006.01)
C07C 311/05 (2006.01)

(54) ИОНИЗИРУЕМЫЕ АМИНОЛИПИДЫ

(31) **62/740,274**
(32) **2018.10.02**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/054240**
(87) **WO 2020/072605 2020.04.09**

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

(72) Изобретатель:
Пармар Рубина Джаре, Скалли Стефен С., Маетани Миках, Лаплака Дерек (US)

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

(57) В изобретении представлены ионизируемые аминолипиды и их соли (например, их фармацевтически приемлемые соли), пригодные для доставки биологически активных агентов, например доставки биологически активных агентов к клеткам для создания сконструированных клеток. Раскрытые в данном документе ионизируемые аминолипиды пригодны в качестве ионизируемых липидов в составе композиций на основе липидных наночастиц.

202190916 A1

202190916 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567907EA/085

ИОНИЗИРУЕМЫЕ АМИНОЛИПИДЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/740274, поданной 2 октября 2018 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

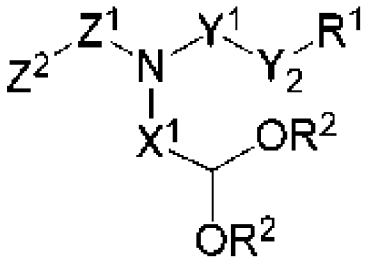
Липидные наночастицы, содержащие ионизируемые аминосодержащие липиды, могут служить транспортными средствами для доставки биологически активных агентов, в частности полинуклеотидов, таких как РНК, мРНК, и направлять РНК в клетки. Композиции LNP, содержащие ионизируемые липиды, облегчают доставку олигонуклеотидных агентов через клеточные мембраны и могут применяться для введения компонентов и композиций для редактирования генов в живые клетки. Биологически активные агенты, которые особенно трудно доставить в клетки, включают в себя белки, лекарственные средства на основе нуклеиновых кислот и их производные, в частности лекарственные средства, которые включают в себя относительно большие олигонуклеотиды, такие как мРНК. Особый интерес представляют композиции для доставки в клетки перспективных технологий редактирования генов, например, для доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 (например, мРНК, кодирующая нуклеазу, и связанная с ней гидовая РНК (гРНК)).

Существует необходимость в композициях для доставки белковых компонентов и компонентов нуклеиновых кислот CRISPR/Cas в клетку, например, в клетку пациента. В частности, особый интерес представляют композиции для доставки мРНК, кодирующей белковый компонент CRISPR, и для доставки гидовых РНК CRISPR. Композиции с полезными свойствами для доставки in vitro и in vivo, которые могут стабилизировать и доставлять РНК-компоненты, также представляют особый интерес.

Краткое изложение сущности изобретения

В данном описании представлены аминосодержащие липиды, применимые для приготовления композиций липидных наночастиц (LNP - англ. lipid nanoparticle). Такие композиции LNP могут обладать свойствами, подходящими для доставки груза нуклеиновой кислоты, такого как компоненты редактирования генов CRISPR/Cas, в клетки.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к соединению формулы I

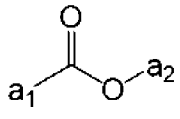
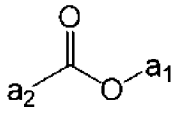


(I)

где, независимо для каждого случая

X^1 представляет собой C_{5-11} алкилен;

Y^1 представляет собой C_{3-11} алкилен;

Y^2 представляет собой  или  , где a_1 представляет собой связь с Y^1, а a_2 представляет собой связь с R^1,

Z^1 представляет собой C_{2-4} алкилен;

Z^2 выбирают из -OH, $-NH_2$, $-OC(=O)R^3$, $-OC(=O)NHR^3$, $-NHC(=O)NHR^3$ и $-NHS(=O)_2R^3$,

R^1 представляет собой C_{4-12} алкил или C_{3-12} алкенил,

каждый R^2 независимо представляет собой C_{4-12} алкил; и

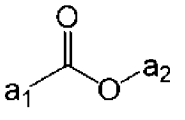
R^3 представляет собой C_{1-3} алкил

или его соль.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где X^1 представляет собой линейный C_{5-11} алкилен, например, линейный C_{6-10} алкилен, предпочтительно линейный C_7 алкилен или линейный C_9 алкилен. В определенных вариантах осуществления X^1 представляет собой линейный C_8 алкилен. В определенных вариантах осуществления X^1 представляет собой линейный C_6 алкилен.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^1 представляет собой линейный C_{4-9} алкилен, например, Y^1 представляет собой линейный C_{5-9} алкилен или линейный C_{6-8} алкилен, предпочтительно Y^1 представляет собой линейный C_7 алкилен.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^2 представляет собой  .

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где R^1 представляет собой C_{4-12} алкенил, например, C_9 алкенил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^1, Y^2 и R^1 выбирают таким образом, чтобы образовать линейную цепь из 16-21 атомов, предпочтительно 16-18 атомов.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Z^1 представляет собой линейный C_{2-4} алкилен, предпочтительно Z^1 представляет собой C_2 алкилен или C_3 алкилен.

В определенном варианте осуществления Z^2 представляет собой -OH. В некоторых вариантах осуществления Z^2 представляет собой $-NH_2$. В определенных вариантах осуществления Z^2 выбирают из $-OC(=O)R^3$, $-OC(=O)NHR^3$, $-NHC(=O)NHR^3$ и $-NHS(=O)_2R^3$, например, Z^2 представляет собой $-OC(=O)R^3$ или $-OC(=O)NHR^3$. В некоторых вариантах осуществления Z^2 представляет собой $-NHC(=O)NHR^3$ или $-NHS(=O)_2R^3$.

В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой метил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где R^1 представляет собой линейный C_{4-12} алкил, например, R^1 представляет собой линейный C_{6-11} алкил, такой как линейный C_{8-10} алкил, предпочтительно R^1 представляет собой линейный C_9 алкил.

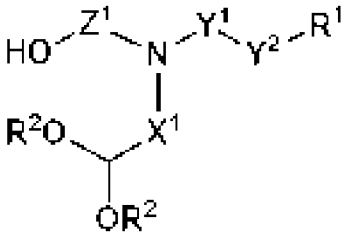
В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где R^1 представляет собой разветвленный C_{6-12} алкил, например, R^1 представляет собой разветвленный C_{7-11} алкил, такой как разветвленный C_8 алкил, разветвленный C_9 алкил или разветвленный C_{10} алкил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 независимо представляет собой C_{5-12} алкил, такой как линейный C_{5-12} алкил. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 независимо представляет собой линейный C_{6-10} алкил, например, линейный C_{6-8} алкил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 независимо представляет собой разветвленный C_{5-12} алкил. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 независимо представляет собой разветвленный C_{6-10} алкил, например, разветвленный C_{7-9} алкил, такой как разветвленный C_8 алкил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где X^1 и один из фрагментов R^2 выбирают таким образом, чтобы образовать линейную цепь из 16-18 атомов, включая атомы углерода и кислорода ацеталя.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к соединению формулы II

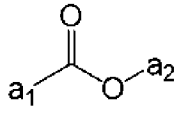
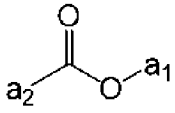


(II),

где, независимо для каждого случая

X^1 представляет собой C_{5-11} алкилен;

Y^1 представляет собой C_{3-10} алкилен;

Y^2 представляет собой  или  , где a_1 представляет собой связь с Y^1, а a_2 представляет собой связь с R^1,

Z^1 представляет собой C_{2-4} алкилен;

R^1 представляет собой C_{4-12} алкил или C_{3-12} алкенил,

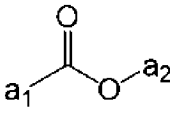
каждый R^2 независимо представляет собой C_{4-12} алкил

или его соль.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где X^1 представляет собой линейный C_{5-11} алкилен, например, линейный C_{6-8} алкилен, предпочтительно линейный C_7 алкилен.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^1 представляет собой линейный C_{5-9} алкилен, например, Y^1 представляет собой C_{4-9} алкилен или линейный C_{6-8} алкилен, предпочтительно Y^1 представляет собой линейный C_7 алкилен.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^2 представляет собой  .

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где R^1 представляет собой C_{4-12} алкенил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^1, Y^2 и R^1 выбирают таким образом, чтобы образовать линейную цепь из 16-21 атомов, предпочтительно 16-18 атомов.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Z^1 представляет собой линейный C_{2-4} алкилен, предпочтительно Z^1 представляет собой C_2 алкилен.

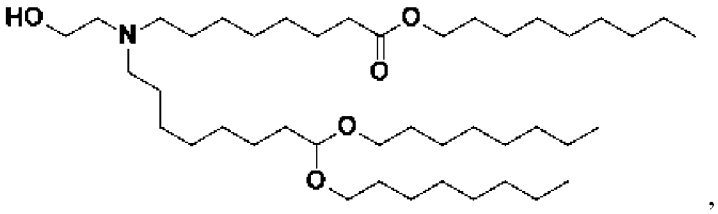
В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому

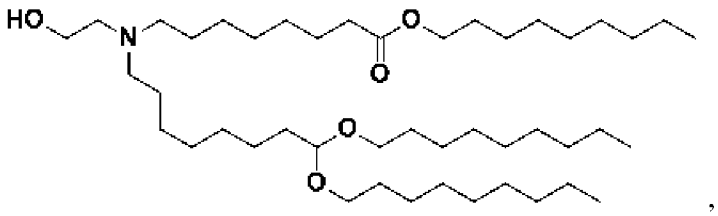
соединению, описанному в данном документе, где R^1 представляет собой линейный C_{4-12} алкил, например, R^1 представляет собой линейный C_{8-10} алкил, предпочтительно R^1 представляет собой линейный C_9 алкил.

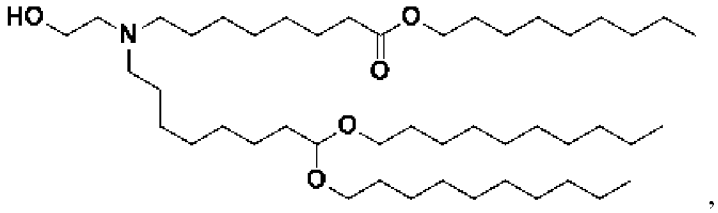
В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 представляет собой C_{5-12} алкил, такой как линейный C_{5-12} алкил. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 представляет собой линейный C_{6-10} алкил, например, линейный C_{6-8} алкил.

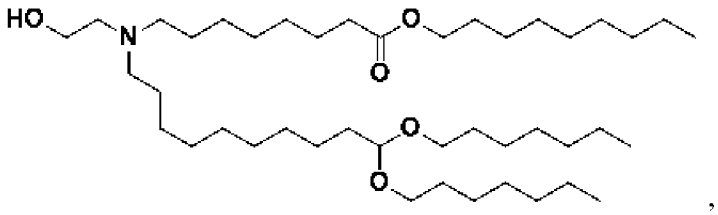
В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где X^1 и один из фрагментов R^2 выбирают таким образом, чтобы образовать линейную цепь из 16-18 атомов, включая атомы углерода и кислорода ацеталя.

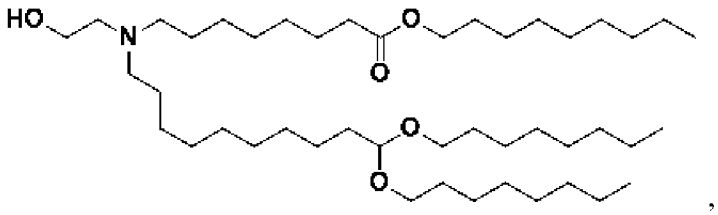
В определенных вариантах осуществления изобретение относится к соединению, выбранному из:

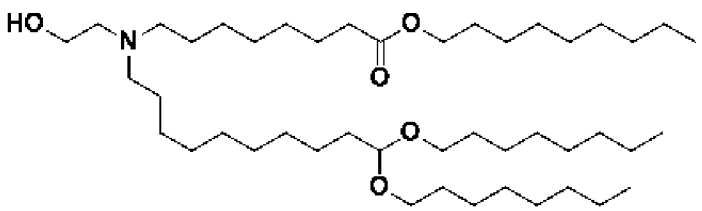

,


,

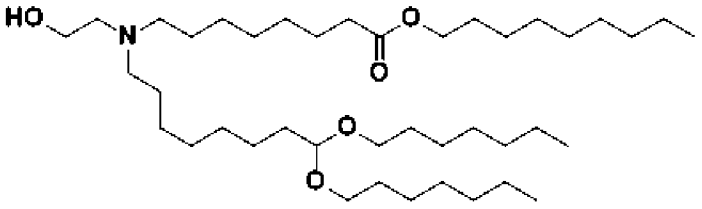

,


,

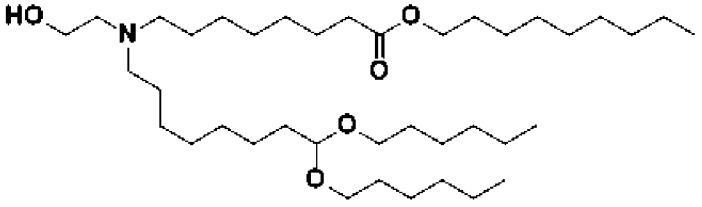

,


HO
N
O
O
O
O

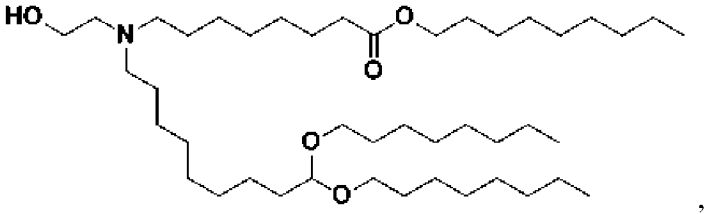
,


HO
N
O
O
O
O

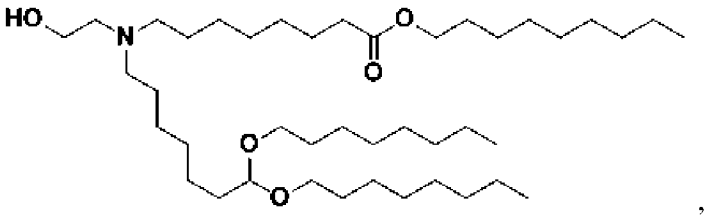
,


HO
N
O
O
O
O

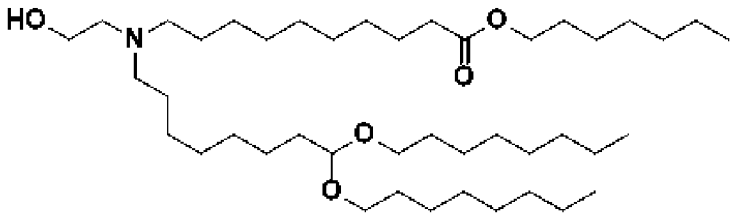
,


HO
N
O
O
O
O

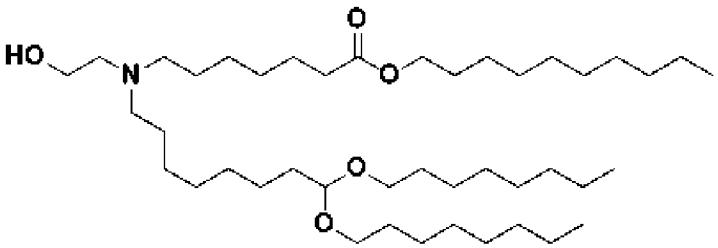
,


HO
N
O
O
O
O

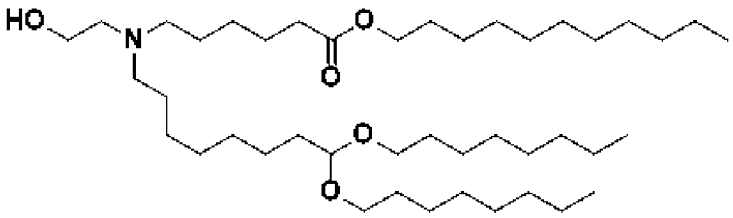
,


HO
N
O
O
O
O

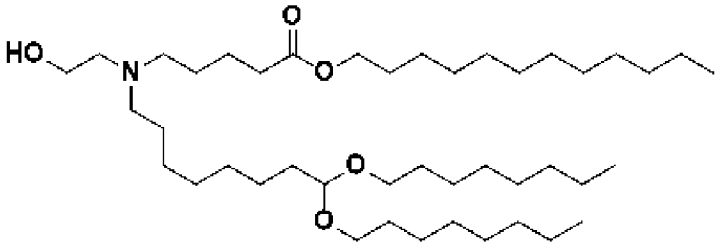
,


HO
N
O
O
O
O

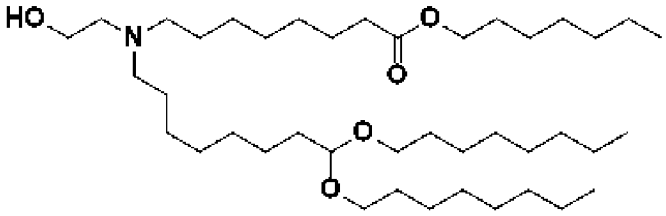
,



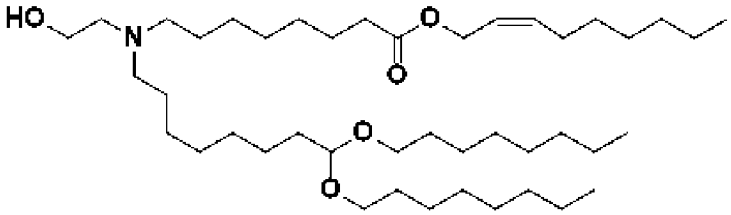
,



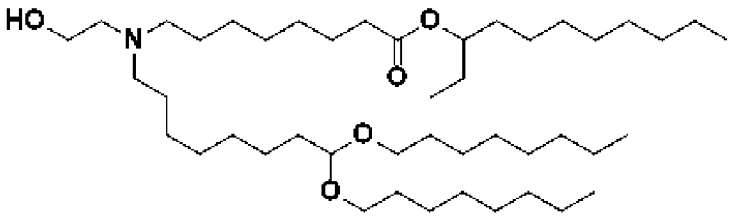
,



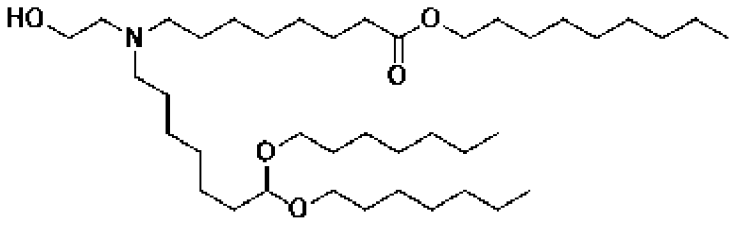
,



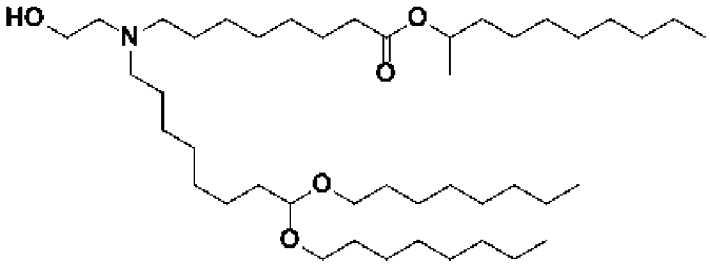
,



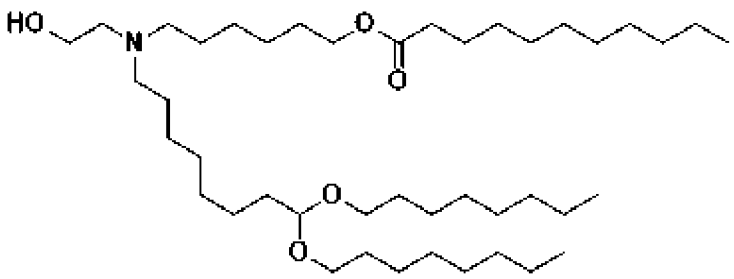
,



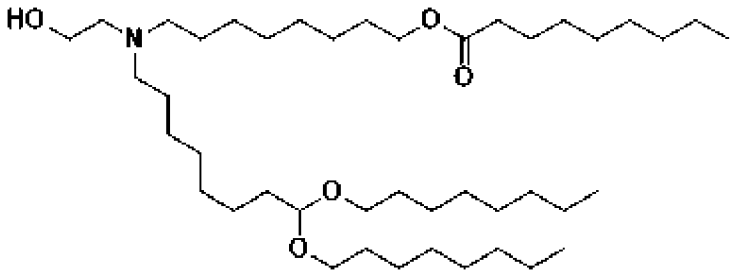
,



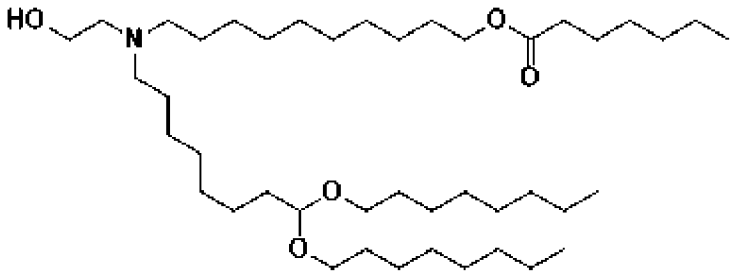
,



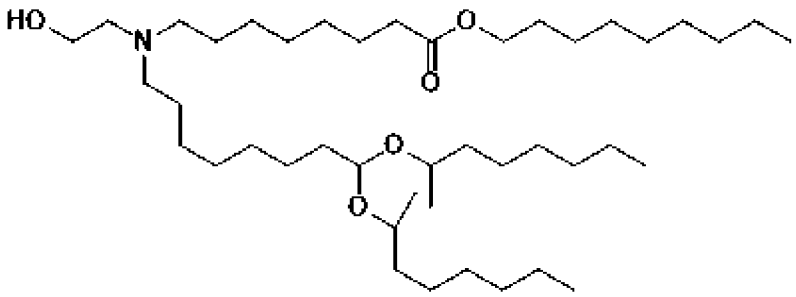
,



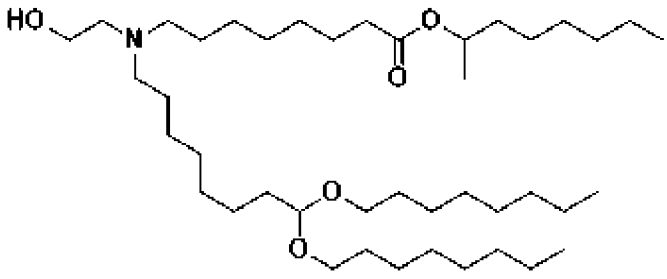
,



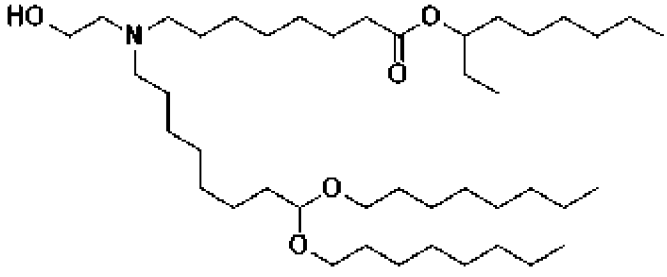
,



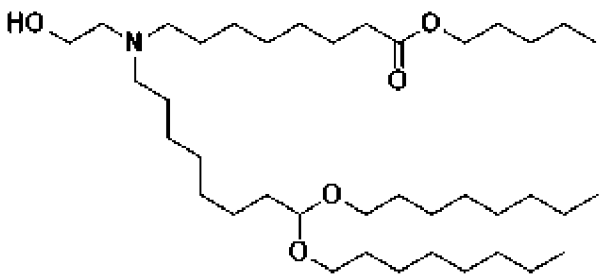
,



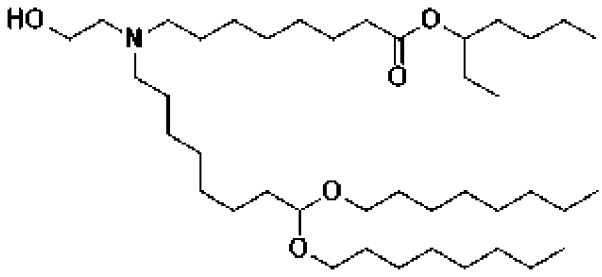
,



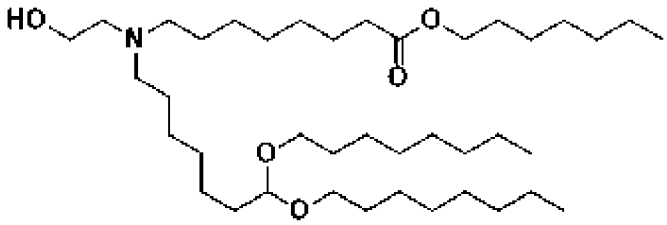
,


HO
N
O
O
O
O

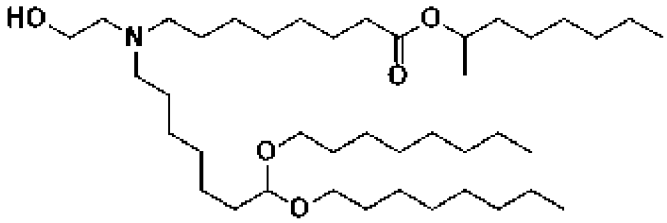
,


HO
N
O
O
O
O

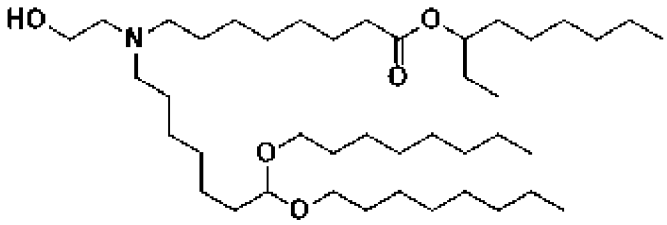
,


HO
N
O
O
O
O

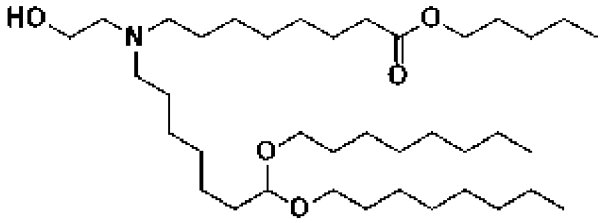
,


HO
N
O
O
O
O

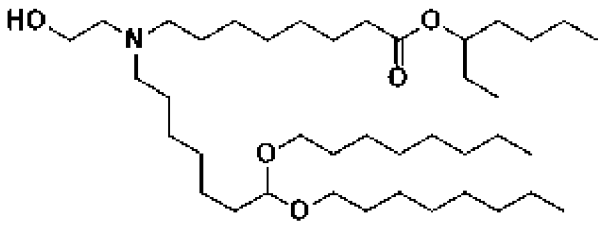
,


HO
N
O
O
O
O

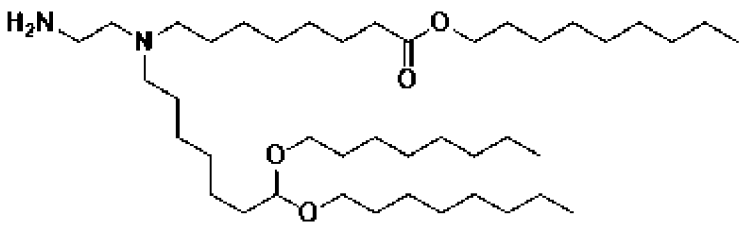
,


HO
N
O
O
O
O

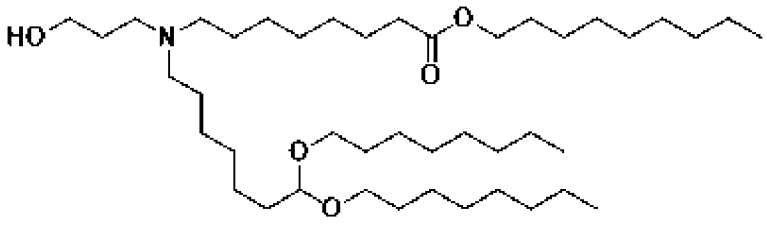
,


HO
N
O
O
O
O

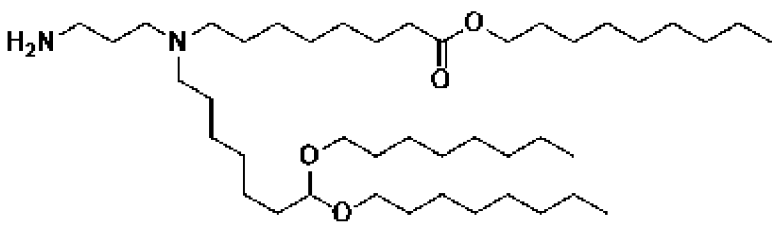
,



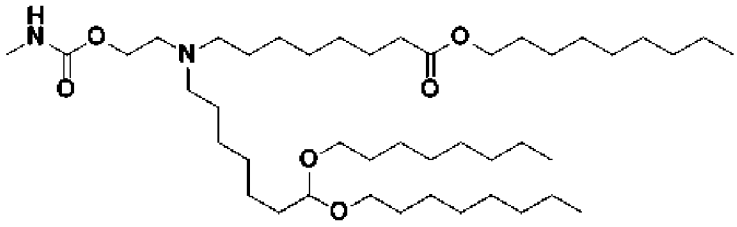
,



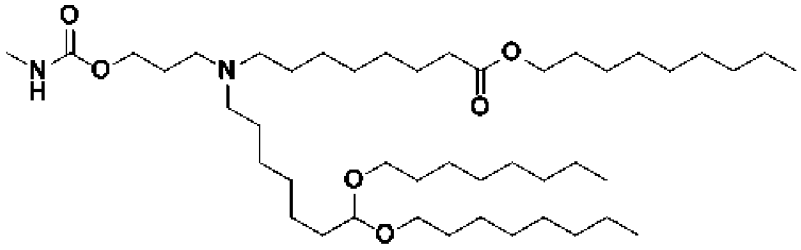
,



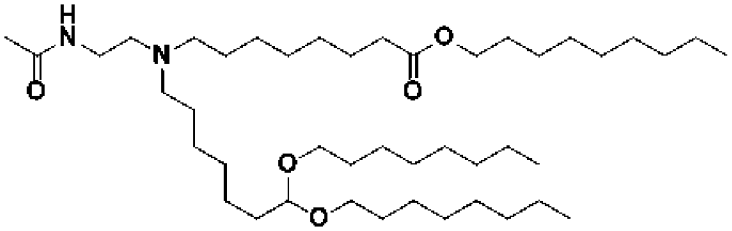
,



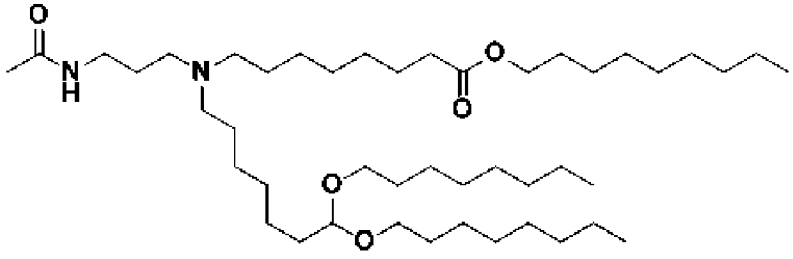
,



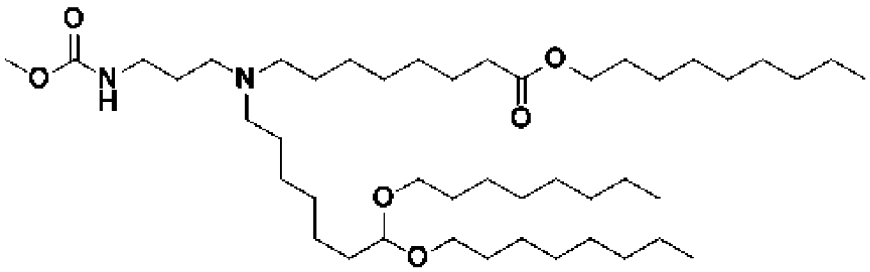
,



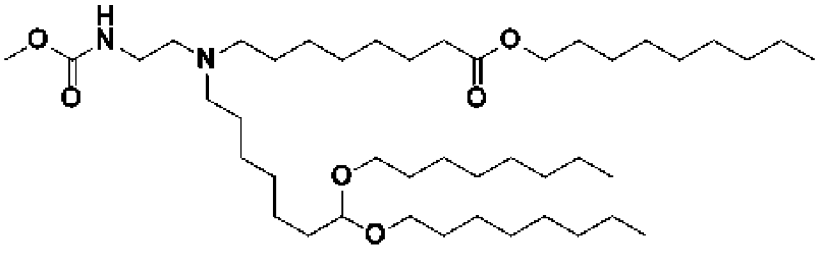
,



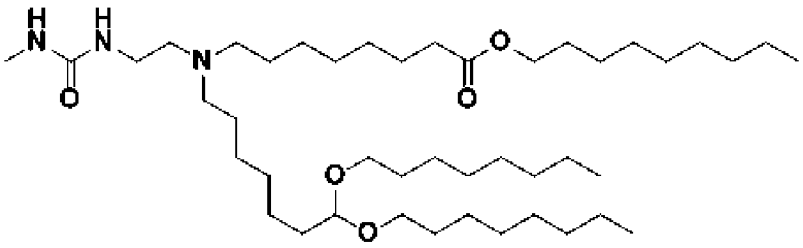
,



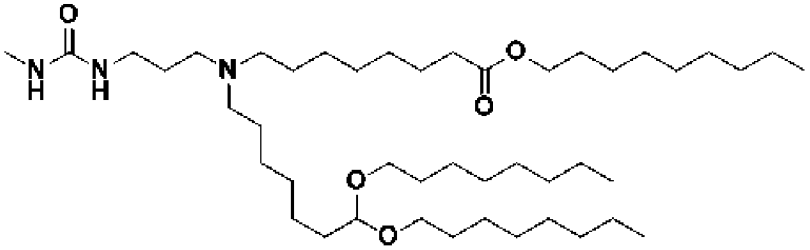
,



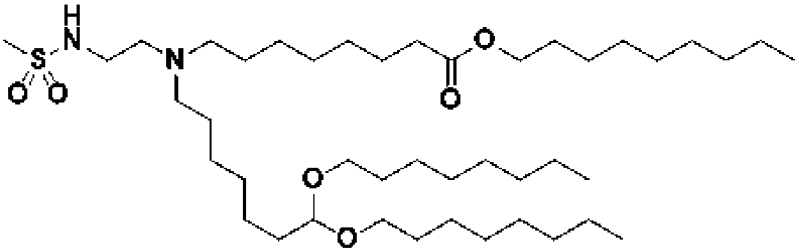
,



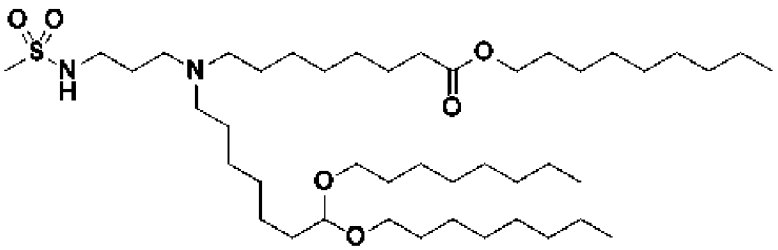
,



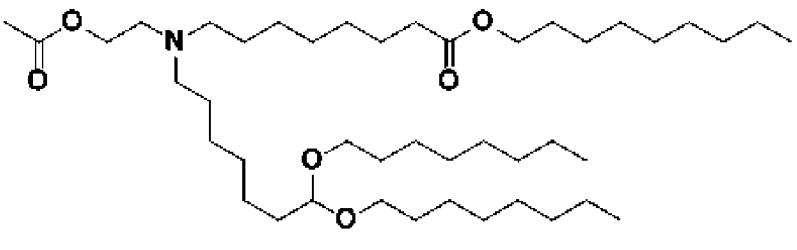
,



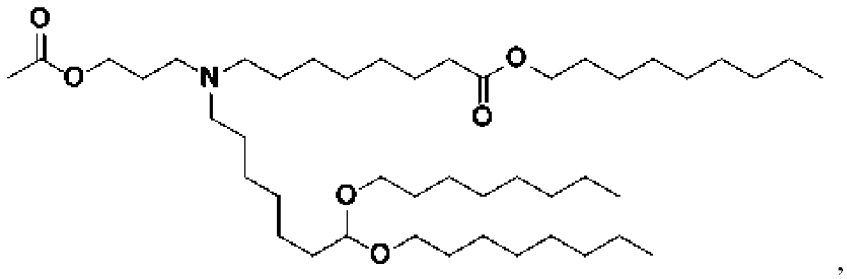
,



,



и



или его соли, предпочтительно фармацевтически приемлемой соли.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где pKa протонированной формы соединения составляет от около 5,1 до около 8,0, например, от около 5,7 до около 6,5, от около 5,7 до около 6,4 или от около 5,8 до около 6,2. В некоторых вариантах осуществления pKa протонированной формы соединения составляет от около 5,5 до около 6,0. В определенных вариантах осуществления pKa протонированной формы соединения составляет от около 6,1 до около 6,3.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к композиции, содержащей любое соединение, описанное в данном документе, и липидный компонент, например, содержащий около 50% соединения по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, и липидный компонент, например, аминолипид, предпочтительно соединение формулы (I) или формулы (II).

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции, описанной в данном документе, причем композиция представляет собой композицию LNP. Например, изобретение относится к композиции LNP, содержащей любое соединение, описанное в данном документе, и липидный компонент. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой липидный компонент содержит хелперный липид и ПЭГ-липид. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой липидный компонент содержит хелперный липид, ПЭГ-липид и нейтральный липид. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, дополнительно содержащей криопротектор. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, дополнительно содержащей буфер.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, дополнительно содержащей компонент нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, дополнительно содержащей РНК- или ДНК-компонент. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, причем композиция LNP имеет соотношение N/P около 3-10, например, соотношение N/P составляет около 6 ± 1, или соотношение N/P составляет около 6 ± 0,5. В определенных вариантах

осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, причем композиция LNP имеет соотношение N/P около 6.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой РНК-компонент содержит мРНК. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой LNP композиции, описанной в данном документе, в которой РНК-компонент содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, мРНК нуклеазы Cas, такую как мРНК нуклеазы Cas класса 2 или мРНК нуклеазы Cas9.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой мРНК представляет собой модифицированную мРНК. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой РНК-компонент содержит нуклеиновую кислоту гРНК. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой нуклеиновая кислота гРНК представляет собой гРНК.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой компонент РНК содержит мРНК нуклеазы Cas класса 2 и гРНК. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой нуклеиновая кислота гРНК представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (дгРНК). В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой нуклеиновая кислота гРНК представляет собой или кодирует одиночную гидовую РНК (огРНК).

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой гРНК представляет собой модифицированную гРНК. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой модифицированная гРНК содержит модификацию на одном или нескольких из первых пяти нуклеотидов на 5’ конце. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, в которой модифицированная гРНК содержит модификацию на одном или нескольких из последних пяти нуклеотидов на 3’ конце.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любой композиции LNP, описанной в данном документе, дополнительно содержащей по меньшей мере одну матричную нуклеиновую кислоту.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу редактирования генов, включающему в себя приведение в контакт клетки с LNP. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанному в данном документе, включающему в себя расщепление ДНК.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу расщепления ДНК, включающему в себя приведение в контакт клетки с композицией LNP. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу расщепления ДНК, описанному в данном документе, в котором стадия расщепления включает в себя введение разрыва одноцепочечной ДНК. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу расщепления ДНК, описанному в данном документе, в котором стадия расщепления включает в себя введение разрыва двухцепочечной ДНК. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу расщепления ДНК, описанному в данном документе, в котором композиция LNP содержит мРНК Cas класса 2 и нуклеиновую кислоту гидовой РНК. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу расщепления ДНК, описанному в данном документе, дополнительно включающему в себя введение в клетку по меньшей мере одной матричной нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу расщепления ДНК, описанному в данном документе, включающему в себя приведение в контакт клетки с композицией LNP, содержащей матричную нуклеиновую кислоту.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанному в данном документе, причем способ включает в себя введение композиции LNP животному, например, человеку. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанному в данном документе, причем способ включает в себя введение композиции LNP в клетку, например, в эукариотическую клетку.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанному в данном документе, причем способ включает в себя введение мРНК в составе первой композиции LNP и второй композиции LNP, содержащей одну или несколько из мРНК, гРНК, нуклеиновой кислоты гРНК и матричной нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанному в данном документе, в котором первую и вторую композиции LNP вводят одновременно. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанному в данном документе, в котором первую и вторую композиции LNP вводят последовательно. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанному в данном документе, причем способ включает в себя введение мРНК и нуклеиновой кислоты гидовой РНК в составе одной композиции LNP.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому способу редактирования генов, описанному в данном документе, в котором

редактирование генов приводит к нокауту гена.

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1 представляет собой график, показывающий процент редактирования B2M в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение формулы (I) или формулы (II) или контроль, как описано в примере 52.

Фигура 2A представляет собой график, показывающий процент редактирования TTR в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) (соединение 1) или контроль, как описано в примере 53. Также показаны данные зависимости доза-эффект.

Фигура 2B представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (мкг/мл), как описано в примере 53. Также показаны данные зависимости доза-эффект.

Фигура 2C представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (%TSS), как описано в примере 53. Также показаны данные зависимости доза-эффект.

Фигура 3 представляет собой график, показывающий процентное соотношение доза-эффект при редактировании B2M в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) (соединение 1) или контроль, как описано в примере 53.

Фигура 4 представляет собой график, показывающий процентное соотношение доза-эффект при редактировании B2M в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) (соединение 4) или контроль, как описано в примере 54.

Фигура 5A представляет собой график, показывающий процент редактирования TTR в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) или контроль, как описано в примере 55. Также показаны данные зависимости доза-эффект.

Фигура 5B представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (мкг/мл), как описано в примере 55. Также показаны данные зависимости доза-эффект.

Фигура 5C представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (%TSS), как описано в примере 55. Также показаны данные зависимости доза-эффект.

Фигура 6A представляет собой график, показывающий процент редактирования TTR в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) или контроль, как описано в примере 58.

Фигура 6B представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (мкг/мл), как описано в примере 58.

Фигура 7A представляет собой график, показывающий процент редактирования

TTR в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) или контроль, как описано в примере 59.

Фигура 7B представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (мкг/мл), как описано в примере 59.

Фигура 8A представляет собой график, показывающий процент редактирования TTR в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) или контроль, как описано в примере 60.

Фигура 8B представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (мкг/мл), как описано в примере 60.

Фигура 9A представляет собой график, показывающий процент редактирования TTR в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) или контроль, как описано в примере 61.

Фигура 9B представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (мкг/мл), как описано в примере 61.

Фигура 10A представляет собой график, показывающий процент редактирования TTR в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение 19, соединение формулы (I) или формулы (II) или контроль, как описано в примере 62.

Фигура 10B представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (мкг/мл), как описано в примере 62.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем описании представлены липиды, в частности ионизируемые липиды, полезные для доставки в клетку биологически активных агентов, в том числе нуклеиновых кислот, таких как РНК-компоненты CRISPR/Cas («груз»), а также способы получения и использования таких композиций. Представлены липиды и их фармацевтически приемлемые соли, необязательно в виде композиций, содержащих липиды, включая композиции LNP. В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать биологически активный агент, например, РНК-компонент, и липидный компонент, который включает в себя соединение формулы (I) или формулы (II), как определено в данном документе. В определенных вариантах осуществления РНК-компонент содержит РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-компонент содержит нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления липиды используются для доставки биологически активного агента, например, нуклеиновой кислоты, такой как мРНК, в клетку, например, клетку печени. В определенных вариантах осуществления РНК-компонент включает в себя гРНК и необязательно мРНК, кодирующую нуклеазу Cas класса 2. Также предложены способы редактирования генов и способы создания сконструированных клеток с использованием

этих композиций.

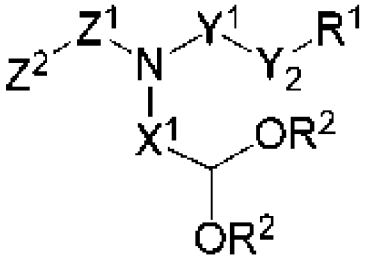
Композиции липидных наночастиц

В данном документе раскрыты различные композиции LNP для доставки биологически активных агентов, таких как нуклеиновые кислоты, например, мРНК и гидовые РНК, включая грузы CRISPR/Cas. Такие композиции LNP включают в себя «ионизируемый аминолипид» наряду с нейтральным липидом, ПЭГ-липидом и хелперным липидом. «Липидная наночастица» или «LNP» относится, без ограничения значения, к частице, которая содержит множество (*m.e.* более одного) компонентов LNP, физически связанных друг с другом межмолекулярными силами.

Липиды

В описании представлены липиды, которые можно использовать в композициях LNP.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к соединению формулы I

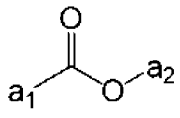
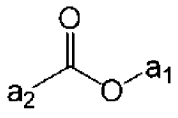


(I)

где, независимо для каждого случая

X^1 представляет собой C_{5-11} алкилен;

Y^1 представляет собой C_{3-11} алкилен;

Y^2 представляет собой  или  , где a_1 представляет собой связь с Y^1, а a_2 представляет собой связь с R^1,

Z^1 представляет собой C_{2-4} алкилен;

Z^2 выбирают из -OH, $-NH_2$, $-OC(=O)R^3$, $-OC(=O)NHR^3$, $-NHC(=O)NHR^3$ и $-NHS(=O)_2R^3$,

R^1 представляет собой C_{4-12} алкил или C_{3-12} алкенил,

каждый R^2 независимо представляет собой C_{4-12} алкил; и

R^3 представляет собой C_{1-3} алкил

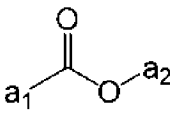
или его соль.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где X^1 представляет собой линейный C_{5-11} алкилен, например, линейный C_{6-10} алкилен, предпочтительно линейный C_7 алкилен или

линейный C_9 алкилен. В определенных вариантах осуществления X^1 представляет собой линейный C_8 алкилен. В определенных вариантах осуществления X^1 представляет собой линейный C_6 алкилен.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^1 представляет собой линейный C_{4-9} алкилен, например, Y^1 представляет собой линейный C_{5-9} алкилен или линейный C_{6-8} алкилен, предпочтительно Y^1 представляет собой линейный C_7 алкилен.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^2 представляет собой 

.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где R^1 представляет собой C_{4-12} алкенил, например, C_9 алкенил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Y^1, Y^2 и R^1 выбирают таким образом, чтобы образовать линейную цепь из 16-21 атомов, предпочтительно 16-18 атомов.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где Z^1 представляет собой линейный C_{2-4} алкилен, предпочтительно Z^1 представляет собой C_2 алкилен или C_3 алкилен.

В определенном варианте осуществления Z^2 представляет собой -OH. В некоторых вариантах осуществления Z^2 представляет собой $-NH_2$. В определенных вариантах осуществления Z^2 выбирают из $-OC(=O)R^3$, $-OC(=O)NHR^3$, $-NHC(=O)NHR^3$ и $-NHS(=O)_2R^3$, например, Z^2 представляет собой $-OC(=O)R^3$ или $-OC(=O)NHR^3$. В некоторых вариантах осуществления Z^2 представляет собой $-NHC(=O)NHR^3$ или $-NHS(=O)_2R^3$.

В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой метил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где R^1 представляет собой линейный C_{4-12} алкил, например, R^1 представляет собой линейный C_{6-11} алкил, такой как линейный C_{8-10} алкил, предпочтительно R^1 представляет собой линейный C_9 алкил.

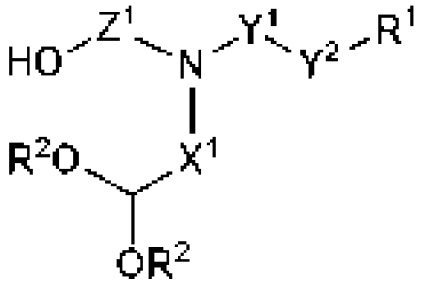
В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где R^1 представляет собой разветвленный C_{6-12} алкил, например, R^1 представляет собой разветвленный C_{7-11} алкил, такой как разветвленный C_8 алкил, разветвленный C_9 алкил или разветвленный C_{10} алкил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 независимо представляет собой C_{5-12} алкил, такой как линейный C_{5-12} алкил. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 независимо представляет собой линейный C_{6-10} алкил, например, линейный C_{6-8} алкил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 независимо представляет собой разветвленный C_{5-12} алкил. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где каждый R^2 независимо представляет собой разветвленный C_{6-10} алкил, например, разветвленный C_{7-9} алкил, такой как разветвленный C_8 алкил.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к любому соединению, описанному в данном документе, где X^1 и один из фрагментов R^2 выбирают таким образом, чтобы образовать линейную цепь из 16-18 атомов, включая атомы углерода и кислорода ацеталя.

В определенных вариантах осуществления липид представляет собой соединение, имеющее структуру Формулы (II):

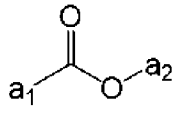
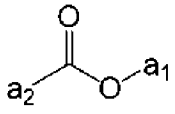


(II)

где, независимо для каждого случая

X^1 представляет собой C_{5-11} алкилен;

Y^1 представляет собой C_{3-10} алкилен;

Y^2 представляет собой  или  , где a_1 представляет собой связь с Y^1, а a_2 представляет собой связь с R^1;

Z^1 представляет собой C_{2-4} алкилен;

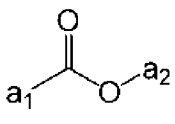
R^1 представляет собой C_{4-12} алкил или C_{3-12} алкенил; и

каждый R^2 независимо представляет собой C_{4-12} алкил

или его соль, такую как фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления X^1 представляет собой линейный C_{5-11} алкилен, предпочтительно линейный C_{6-8} алкилен, более предпочтительно C_7 алкилен.

В определенных вариантах осуществления Y^1 представляет собой линейный C_{5-9} алкилен, например, линейный C_{6-8} алкилен или линейный C_{4-9} алкилен, предпочтительно линейный C_7 алкилен.

В определенных вариантах осуществления Y^2 представляет собой  .

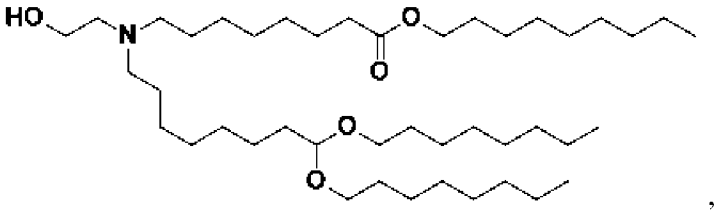
В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой C_{4-12} алкил, предпочтительно линейный C_{8-10} алкил, более предпочтительно линейный C_9 алкил. В

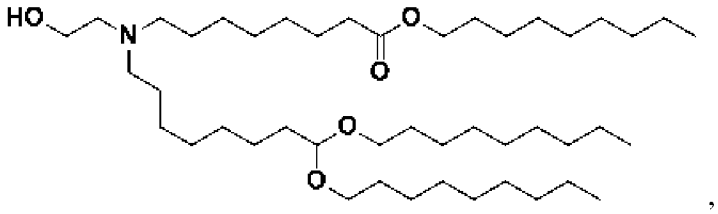
некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой C_{4-12} алкенил.

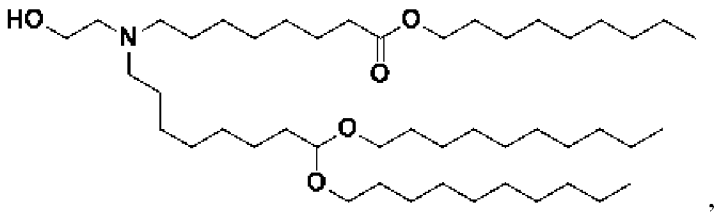
В определенных вариантах осуществления Z^1 представляет собой линейный C_{2-4} алкилен, предпочтительно C_2 алкилен.

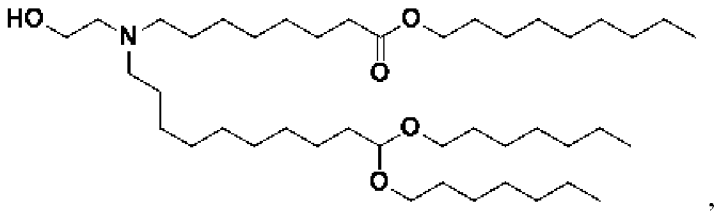
В определенных вариантах осуществления R^2 представляет собой линейный C_{5-12} алкил, например, линейный C_{6-10} алкил, такой как линейный C_{6-8} алкил.

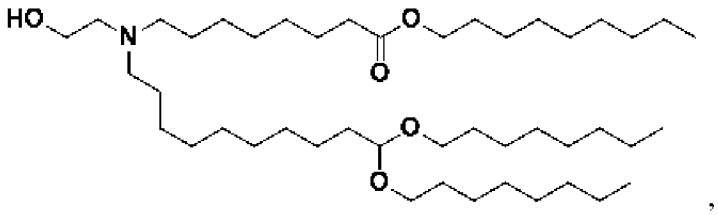
Типичные соединения формулы (I) включают в себя:

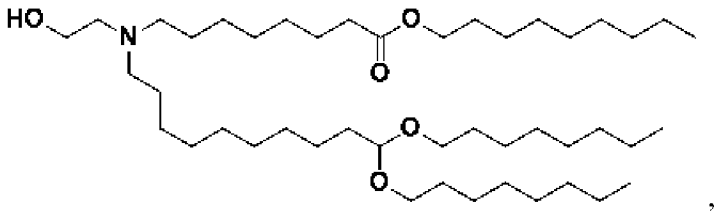

,

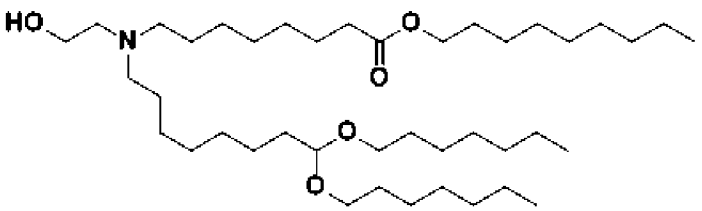

,

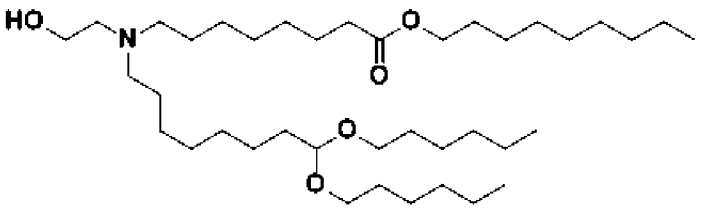

,

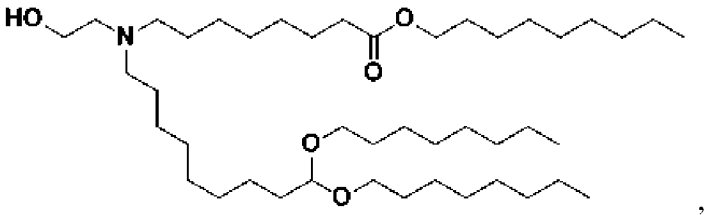

,

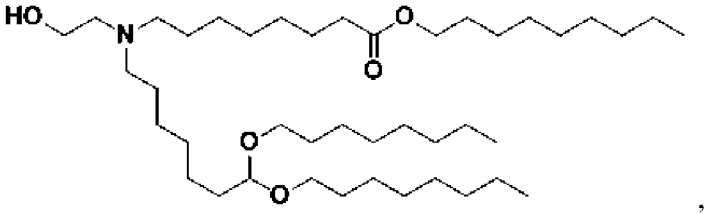

,

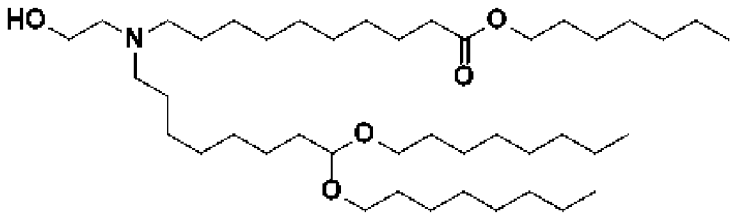

,

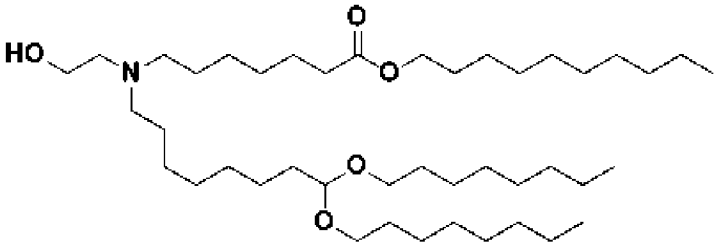

,

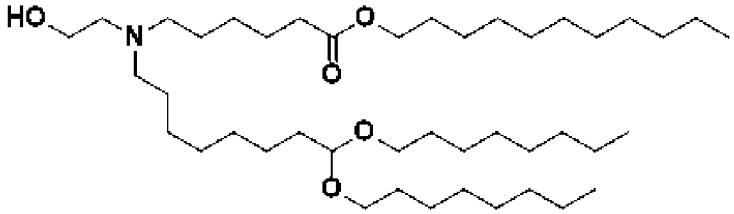

,

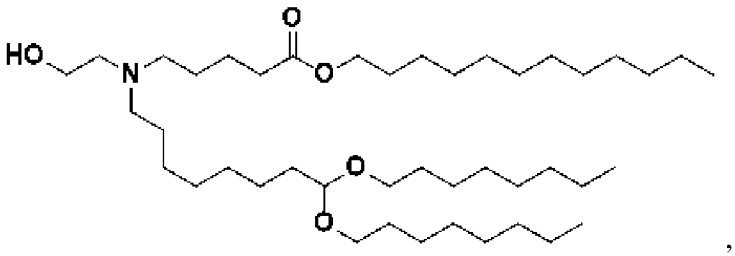

,


,

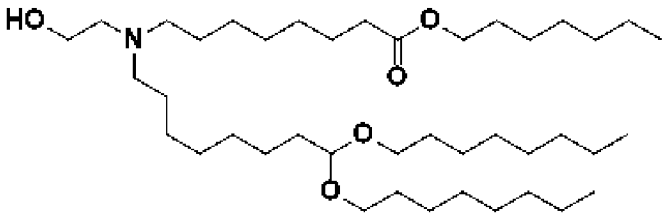

,


,

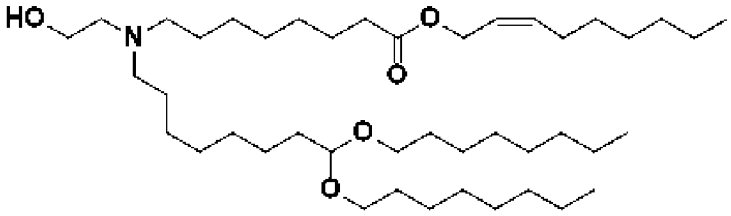

.



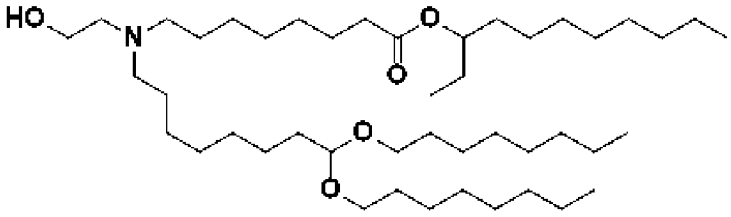
,



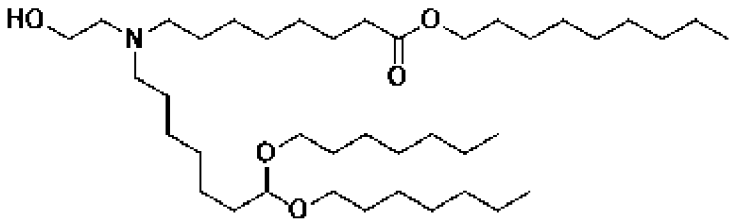
,



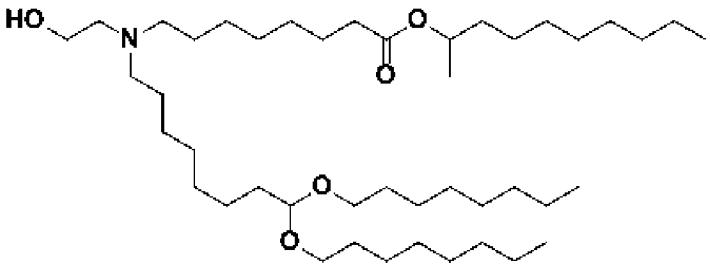
,



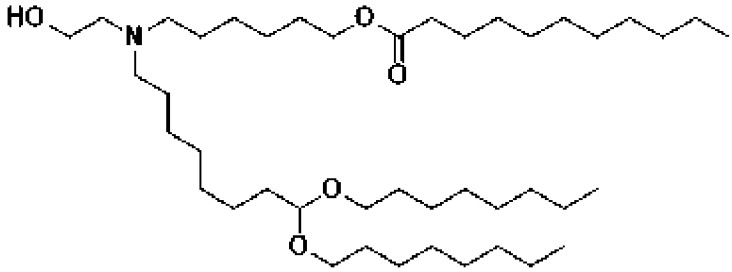
,



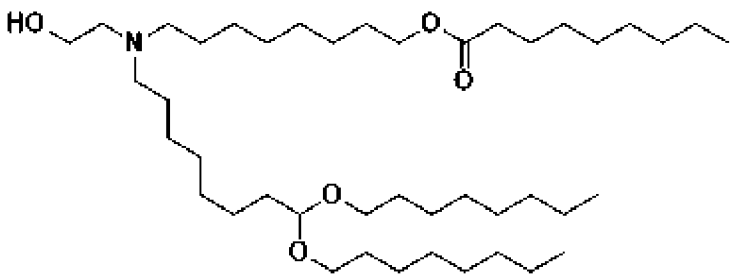
,



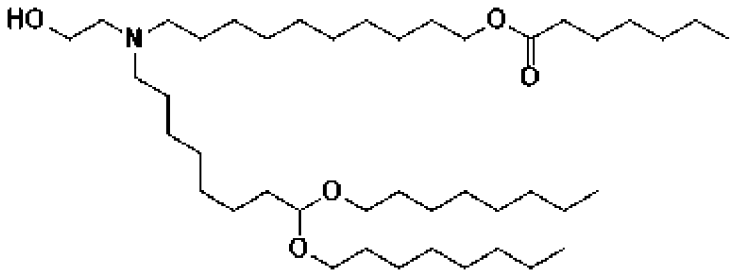
,



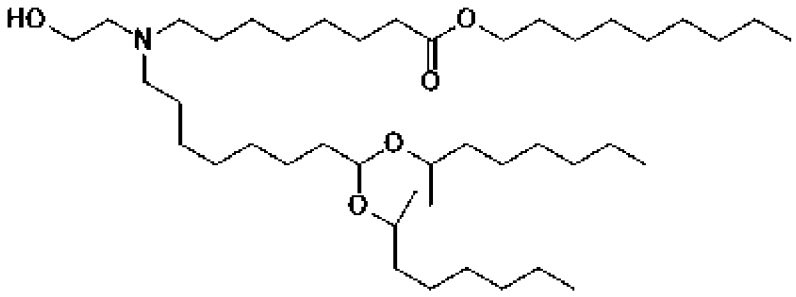
,



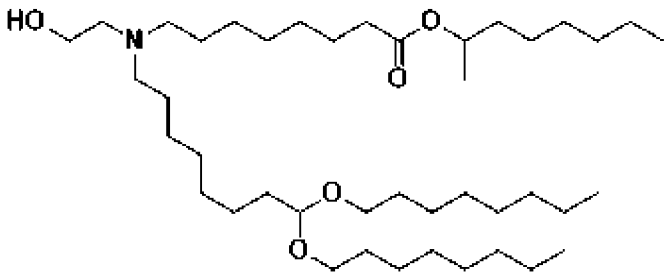
,



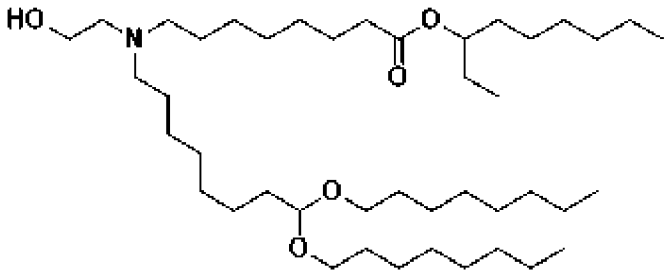
,



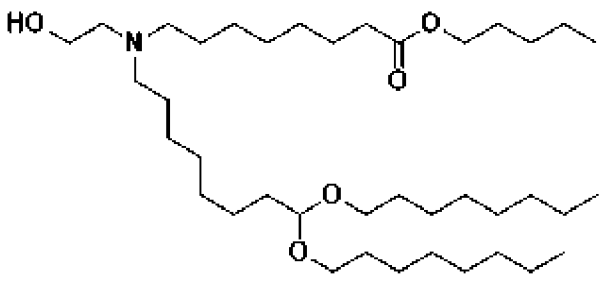
,



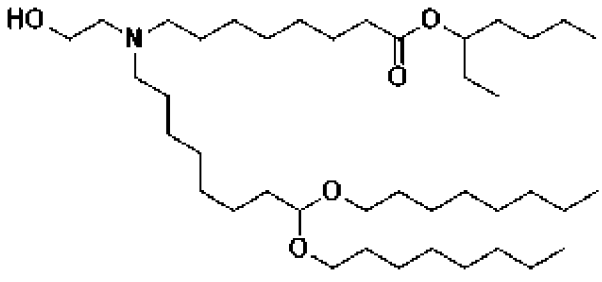
,



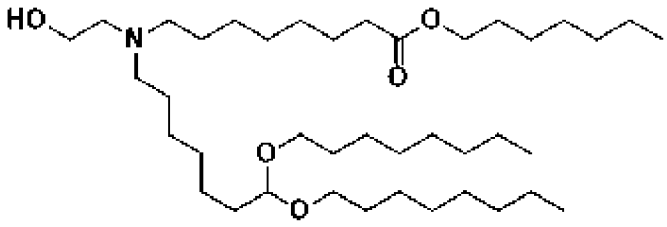
,



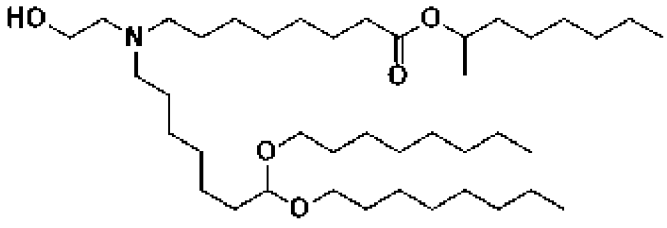
,



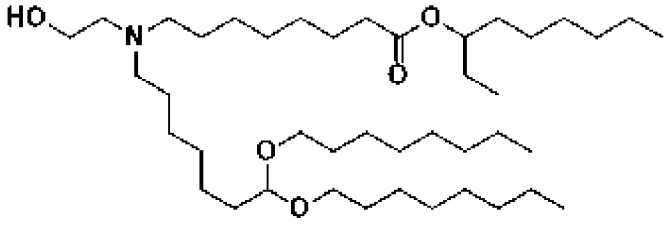
,



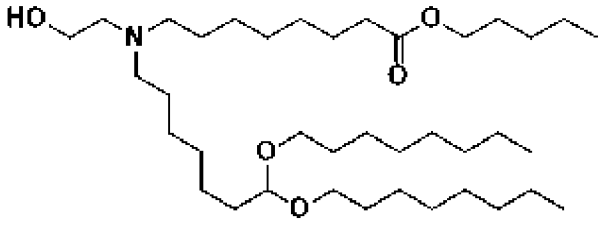
,



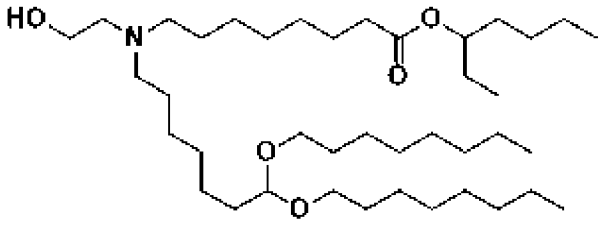
,



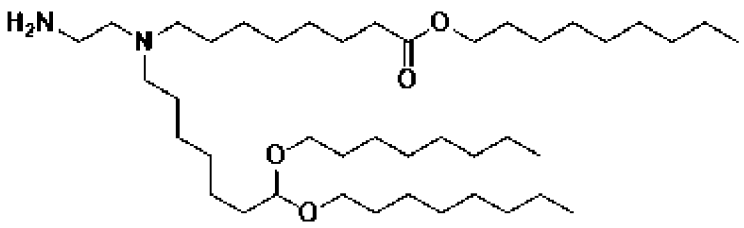
,



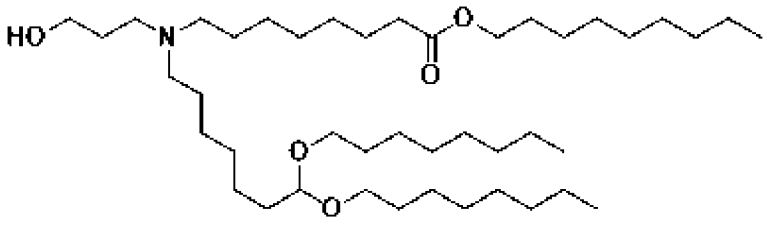
,



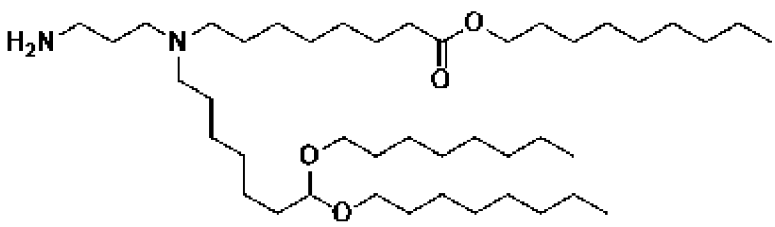
,



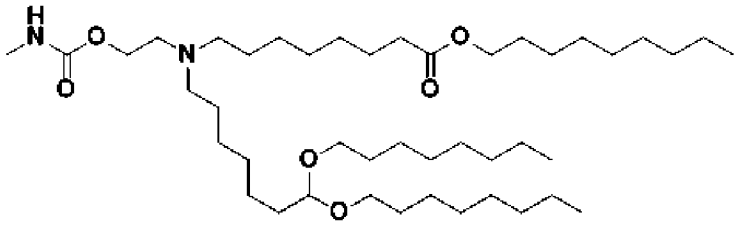
,



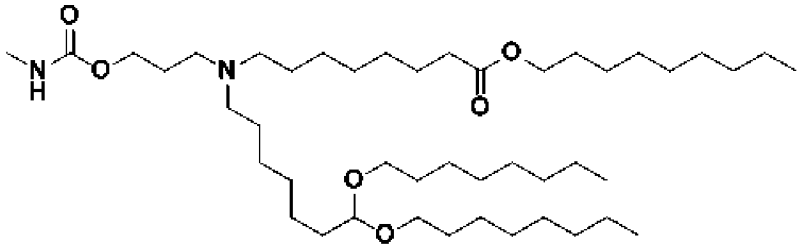
,



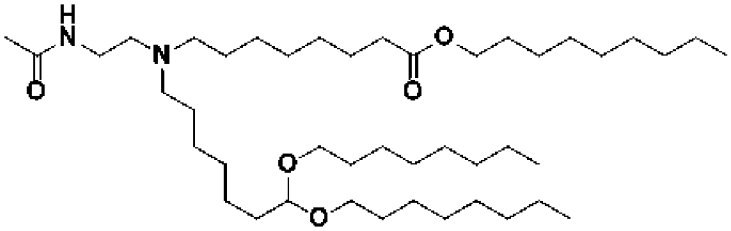
,



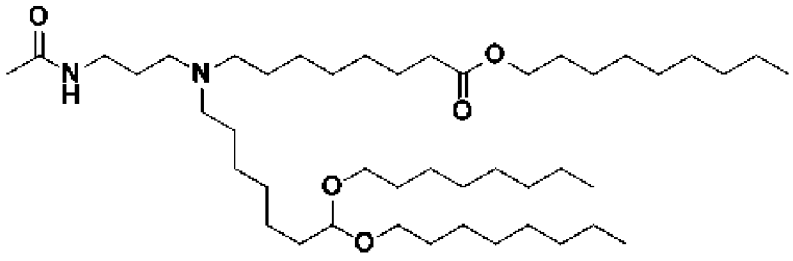
,



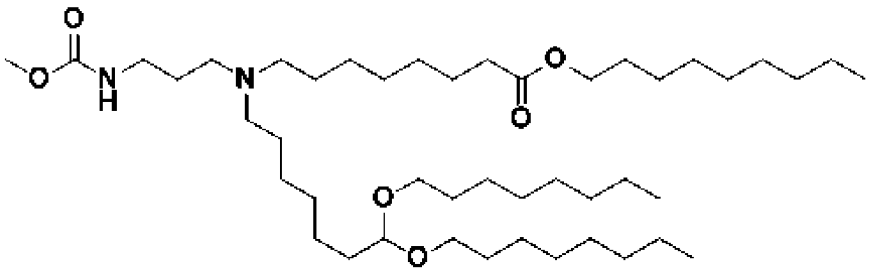
,



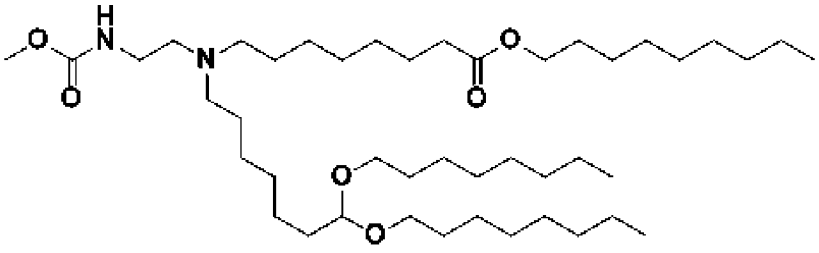
,



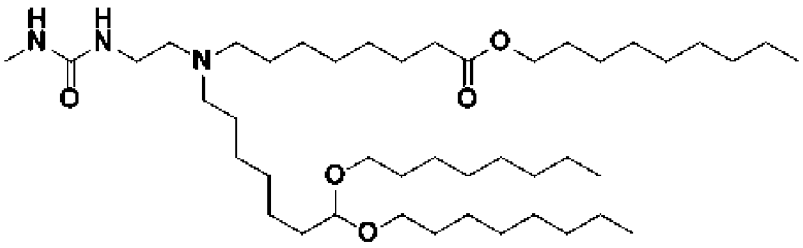
,



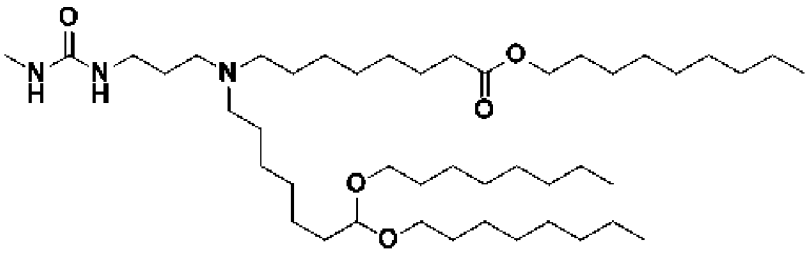
,



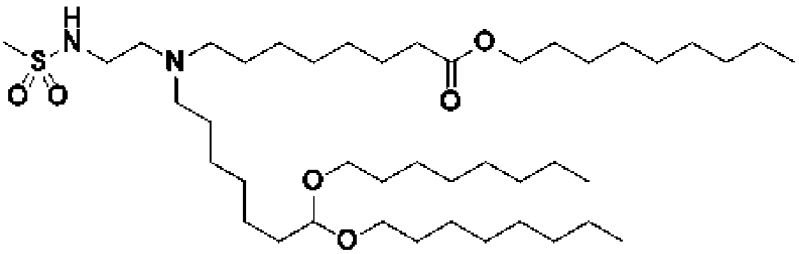
,



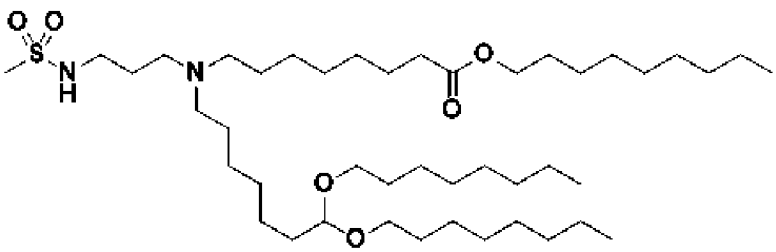
,



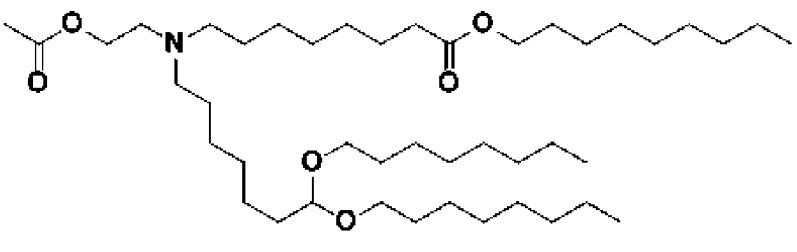
,



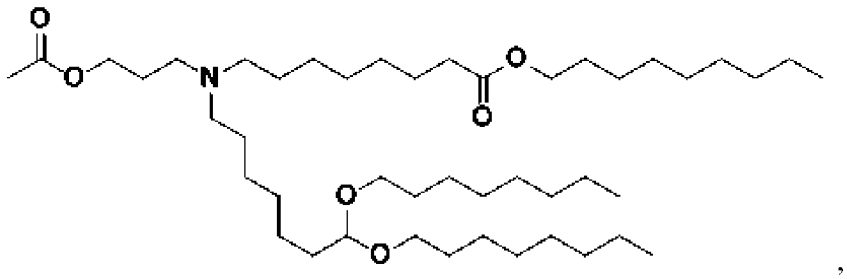
,



,



, и



,

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 75% соединения формулы (I) или формулы (II) липидных композиций, составленных в соответствии с описанием в данном документе, выводится из плазмы субъекта в течение 8, 10, 12, 24 или 48 часов, или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 дней после введения. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 50% липидных композиций, содержащих соединение формулы (I) или формулы (II), как раскрыто в данном документе, выводятся из плазмы субъекта в течение 8, 10, 12, 24 или 48 часов, или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 дней после введения, что может быть определено, например, путем измерения липида (*например,* соединения формулы (I) или формулы (II)), РНК (*например,* мРНК) или другого компонента в плазме. В определенных вариантах осуществления измеряется инкапсулированный в липид и свободный от липида компонент липидной композиции в виде РНК или нуклеиновой кислоты.

Клиренс липидов может быть измерен, как описано в литературе. См. Maier, M.A., et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. Mol. Ther. 2013, 21(8), 1570-78 (“Maier”). Например, в публикации Maier системы LNP-киРНК, содержащие киРНК, нацеленную на люциферазы, вводили самцам мышей C57Bl/6 в возрасте от шести до восьми недель в дозе 0,3 мг/кг путем внутривенной болюсной инъекции *через* латеральную хвостовую вену. Образцы крови, печени и селезенки отбирали через 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 и 168 часов после введения дозы. Мышей перфузировали физиологическим раствором перед отбором ткани, и образцы крови обрабатывали для получения плазмы. Все образцы обрабатывали и анализировали методом ЖХ/МС. Кроме того, Maier описывает процедуру оценки токсичности после введения композиций LNP-киРНК. Например, киРНК, нацеленную на люциферазу, вводили в дозах 0, 1, 3, 5 и 10 мг/кг (5 животных на группу) путем однократного внутривенного болюсного введения в объеме дозы 5 мл/кг самцам крыс линии Спрег-Доули. Через 24 часа из яремной вены у бодрствующих животных получали около 1 мл крови и выделяли сыворотку. Через 72 часа после введения дозы всех животных подвергали умерщвлению для вскрытия. Была проведена оценка клинических проявлений, массы тела, химического состава сыворотки, массы органов и гистопатологии. Хотя Maier описывает способы оценки композиций киРНК-LNP, эти способы могут применяться для оценки клиренса, фармакокинетики и токсичности введения липидных композиций, таких как композиции LNP согласно настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления липидные композиции, в которых

используются соединения формулы (I) или формулы (II), раскрытые в данном документе, демонстрируют повышенную скорость клиренса по сравнению с альтернативными ионизируемыми аминолипидами. В некоторых таких вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость клиренса липидов, например, скорость, с которой соединение формулы (I) или формулы (II) выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость клиренса груза (например, биологически активного агента), например, скорость, с которой компонент груза выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость клиренса РНК, например, скорость, с которой мРНК или гРНК выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость, с которой LNP выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость, с которой LNP выводится из ткани, такой как ткань печени или ткань селезенки. Желательно, чтобы высокая скорость клиренса могла привести к профилю безопасности без существенных побочных эффектов и/или к снижению накопления LNP в кровотоке и/или в тканях.

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

pH, при котором соединение формулы (I) или формулы (II) является преимущественно протонированным, связан с присущим ему pKa. В предпочтительных вариантах осуществления соль соединения формулы (I) или формулы (II) по настоящему раскрытию имеет pKa в диапазоне от около 5,1 до около 8,0, даже более предпочтительно от около 5,5 до около 7,5, например, от около 6,1 до около 6,3. В других предпочтительных вариантах осуществления соль соединения формулы (I) по настоящему раскрытию имеет pKa в диапазоне от около 5,3 до около 8,0, например, от около 5,7 до около 6,5. В других вариантах осуществления соль соединения формулы (I) или формулы (II) по настоящему раскрытию имеет pKa в диапазоне от около 5,7 до около 6,4, например, от около 5,8 до около 6,2. В других предпочтительных вариантах осуществления соль соединения формулы (I) по настоящему раскрытию имеет pKa в диапазоне от около 5,7 до около 6,5, например, от около 5,8 до около 6,4. Альтернативно, соль соединения формулы (I) или формулы (II) по настоящему раскрытию имеет pKa в диапазоне от около 5,8 до

около 6,5. В некоторых вариантах осуществления pKa протонированной формы соединения формулы (I) или формулы (II) составляет от около 5,5 до около 6,0. Соль соединения формулы (I) или формулы (II) по настоящему раскрытию может иметь pKa в диапазоне от около 6,0 до около 8,0, предпочтительно от около 6,0 до около 7,5. pKa соли соединения формулы (I) или формулы (II) может быть важным фактором при составлении LNP, поскольку было обнаружено, что LNP, составленные с определенными липидами, имеющими pKa в диапазоне от около 5,5 до около 7,0, эффективны для доставки груза in vivo, *например*, в печень. Кроме того, было обнаружено, что LNP, составленные с определенными липидами, имеющими pKa в диапазоне от около 5,3 до около 6,4, эффективны для доставки in vivo, *например*, в опухоли. *См.*, *например*, WO 2014/136086.

Дополнительные липиды

«Нейтральные липиды», подходящие для применения в липидной композиции согласно описанию, включают в себя, например, различные нейтральные, незаряженные или цвиттер-ионные липиды. Примеры нейтральных фосфолипидов, пригодных для применении в данном раскрытии, включают в себя, но не ограничиваются ими, дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), фосфохолин (DOPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), фосфатидилхолин (PLPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DAPC), фосфатидилэтаноламин (PE), яичный фосфатидилхолин (EPC), дилаурилоилфосфатидилхолин (DLPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин (MPPC), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолин (PMPC), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин (PSPC), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DBPC), 1-стеароил-2-пальмитоил фосфатидилхолин (SPPC), 1,2-диэйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC), пальмитоилолеоил фосфатидилхолин (POPC), лизофосфатидилхолин, диолеоил фосфатидилэтаноламин (DOPE), дилинолеоилфосфатидилхолин дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), димиристоил фосфатидилэтаноламин (DMPE), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), лизофосфатидилэтаноламин и их комбинации. В определенных вариантах осуществления нейтральный фосфолипид может быть выбран из дистеароилфосфатидилхолина (DSPC) и димиристоилфосфатидилэтаноламина (DMPE), предпочтительно дистеароилфосфатидилхолина (DSPC).

«Хелперные липиды» включают в себя стероиды, стерины и алкилрезорцины. Хелперные липиды, подходящие для применения в настоящем раскрытии, включают в себя, но не ограничиваются ими, холестерин, 5-гептадецилрезорцин и гемисукцинат холестерина. В определенных вариантах осуществления хелперный липид может представлять собой холестерин или его производное, такое как гемисукцинат холестерина.

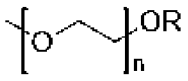
ПЭГ-липиды могут влиять на продолжительность существования наночастиц in vivo (*например*, в крови). ПЭГ-липиды могут способствовать процессу изготовления

состава, например, путем снижения агрегации частиц и контроля размера частиц. Используемые в данном документе ПЭГ-липиды могут модулировать фармакокинетические свойства LNP. Как правило, ПЭГ-липид содержит липидный фрагмент и полимерный фрагмент на основе ПЭГ (иногда называемый поли(этиленоксидом)) (ПЭГ-фрагмент). ПЭГ-липиды, подходящие для использования в липидной композиции с соединением формулы (I) или формулы (II) по настоящему раскрытию, и информацию о биохимии таких липидов можно найти в Romberg et al., Pharmaceutical Research 25(1), 2008, pp. 55-71 и Hoekstra et al., Biochimica et Biophysica Acta 1660 (2004) 41-52. Дополнительные подходящие ПЭГ-липиды раскрыты, например, в WO 2015/095340 (стр. 31, строчка 14 - стр. 37, строчка 6), WO 2006/007712 и WO 2011/076807 («липиды-невидимки»).

В некоторых вариантах осуществления липидный фрагмент может быть получен из диацилглицерина или диацилгликамида, включая те, которые содержат диалкилглицериновую или диалкилгликамидную группу, имеющую длину алкильной цепи, независимо содержащую от около C4 до около C40 насыщенных или ненасыщенных атомов углерода, причем цепь может содержать одну или более функциональных групп, таких как, например, амид или сложный эфир. В некоторых вариантах осуществления длина алкильной цепи составляет от около C10 до C20. Диалкилглицериновая или диалкилгликамидная группа может дополнительно содержать одну или более замещенных алкильных групп. Длина цепи может быть симметричной или асимметричной.

Если не указано иное, термин «ПЭГ», используемый в данном документе, означает любой полиэтиленгликоль или другой полиалкиленэфирный полимер, такой как необязательно замещенный линейный или разветвленный полимер этиленгликоля или этиленоксида. В определенных вариантах осуществления ПЭГ-фрагмент является незамещенным. Альтернативно, ПЭГ-фрагмент может быть замещен, *например*, одной или более алкильными, алкокси, ацильными, гидрокси или арильными группами. Например, ПЭГ-фрагмент может содержать сополимер ПЭГ, такой как ПЭГ-полиуретан или ПЭГ-полипропилен (см., *например.*, J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)); альтернативно, ПЭГ-фрагмент может быть гомополимером ПЭГ. В определенных вариантах осуществления ПЭГ-фрагмент имеет молекулярную массу от около 130 до около 50000, например, от около 150 до около 30000 или даже от около 150 до около 20000. Аналогично, ПЭГ-фрагмент может иметь молекулярную массу от около 150 до около 15000, от около 150 до около 10000, от около 150 до около 6000 или даже от около 150 до около 5000. В определенных предпочтительных вариантах осуществления ПЭГ-фрагмент имеет молекулярную массу от около 150 до около 4000, от около 150 до около 3000, от около 300 до около 3000, от около 1000 до около 3000 или от около 1500 до около 2500.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления ПЭГ-фрагмент представляет собой «ПЭГ-2К», также называемый «ПЭГ 2000», который имеет среднюю молекулярную массу около 2000 дальтон. ПЭГ-2К представлен в данном документе

формулой (II), где n равен 45, что означает, что среднечисловая степень полимеризации составляет около 45 субъединиц  (II). Однако могут быть использованы другие варианты осуществления ПЭГ, известные в данной области техники, включая, *например*, те, где среднечисловая степень полимеризации составляет около 23 субъединиц (n=23) и/или 68 субъединиц (n=68). В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 30 до около 60. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 35 до около 55. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 40 до около 50. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 42 до около 48. В некоторых вариантах осуществления n может равняться 45. В некоторых вариантах осуществления R может быть выбран из H, замещенного алкила и незамещенного алкила. В некоторых вариантах осуществления R может представлять собой незамещенный алкил, такой, как метил.

В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, ПЭГ-липид может быть выбран из ПЭГ-дилауроилглицерина, ПЭГ-димиристоилглицерина (ПЭГ-ДМГ) (кат. № GM-020 от NOF, Токио, Япония), ПЭГ-дипальмитоилглицерина, ПЭГ-дистеароилглицерина (ПЭГ-ДСФЭ) (кат. № DSPE-020CN, NOF, Токио, Япония), ПЭГ-дилаурилгликамида, ПЭГ-димиристилгликамида, ПЭГ-дипальмитоилгликамида и ПЭГ-дистеароилгликамида, ПЭГ-холестерина (1-[8'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диоксаоктанил]карбамоил-[омега]-метил-поли(этиленгликоль), ПЭГ-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполи(этиленгликолевый) эфир), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоля)-2000] (ПЭГ2k-ДМГ), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоля)-2000] (ПЭГ2k-DSPE) (кат. № 880120C от Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, США), 1,2-дистеароил-sn-глицерина, метоксиполиэтиленгликоля (ПЭГ2k-ДСГ; GS-020, NOF Токио, Япония), поли(этиленгликоль)-2000-диметакрилата (ПЭГ2k-ДМА) и 1,2-дистеарилоксипропил-3-амин-N-[метокси(полиэтиленгликоля)-2000] (ПЭГ2k-ДСА). В определенных таких вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-ДМГ. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-ДСГ. В других вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-ДСФЭ. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-ДМА. В еще других вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-ДМА. В определенных вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой соединение S027, описанное в WO2016/010840 (параграфы с [00240] по [00244]). В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-ДСА. В других вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-C11. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-C14. В некоторых вариантах осуществления

ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-С16. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2k-С18.

Катионные липиды, подходящие для использования в липидной композиции по данному изобретению, включают в себя, но не ограничиваются ими, N, N-диолеил-N, N-диметиламмонийхлорид (DODAC), N, N-дистеарил-N, N-диметиламмонийбромид (DDAB), N-(1-(2,3-диолеоилокси)пропил)-N, N,N-триметиламмонийхлорид (DOTAP), 1,2-диолеоил-3-диметиламмонийпропан (DODAP), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N, N,N-триметиламмонийхлорид (DOTMA), 1,2-диолеоилкарбамил-3-диметиламмонийпропан (DOCDAP), 1,2-дилинеоил-3-диметиламмонийпропан (DLINDAP), дилаурил(С12:0) триметиламмонийпропан (DLTAP), диоктадециламидоглицилспермин (DOGS), DC-Choi, диолеилокси-N-[2-(сперминкарбоксамидо)этил]-N, N-диметил-1-пропанаминийтрифторацетат (DOSPA), 1,2-димиристилоксипропил-3-диметил-гидроксиэтиламмонийбромид (DMRIE), 3-диметиламино-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис, цис-9,12-октадекадиенокси)пропан (CLinDMA), N, N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 2-[5'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)-3'-оксапентокси)-3-диметил-1-(цис, цис-9',1-2'-октадекадиенокси)пропан (CpLinDMA), N, N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин (DMOBA) и 1,2-N, N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DOcarbDAP). В одном варианте осуществления катионный липид представляет собой DOTAP или DLTAP.

Анионные липиды, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают в себя, но не ограничиваются ими, фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидиновую кислоту, N-додеканоилфосфатидилэтаноламин, N-сукцинилфосфатидилэтаноламин, N-глутарилфосфатидилэтаноламинхолестерингемисукцинат (CHEMS) и лизилфосфатидилглицерин.

Липидные композиции

В настоящем изобретении предложена липидная композиция, содержащая по меньшей мере одно соединение формулы (I) или формулы (II), или его соль (например, его фармацевтически приемлемую соль), и по меньшей мере один другой липидный компонент. Такие композиции также могут содержать биологически активный агент необязательно в комбинации с одним или более другими липидными компонентами. В некоторых вариантах осуществления липидные композиции содержат липидный компонент и водный компонент, содержащий биологически активный агент.

В одном варианте осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере один другой липидный компонент. В другом варианте осуществления липидная композиция дополнительно содержит биологически активный агент необязательно в комбинации с одним или более другими липидными компонентами. В другом варианте осуществления липидная композиция находится в форме липосомы. В другом варианте осуществления липидная композиция находится в форме липидной наночастицы (LNP). В

другом варианте осуществления липидная композиция подходит для доставки в печень.

В одном варианте осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, и другой липидный компонент. Такие другие липидные компоненты включают в себя, но не ограничиваются ими, нейтральные липиды, хелперные липиды, ПЭГ-липиды, катионные липиды и анионные липиды. В определенных вариантах осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, и нейтральный липид, например, DSPC, необязательно с одним или более дополнительными липидными компонентами. В другом варианте осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, и хелперный липид, например, холестерин, необязательно с одним или более дополнительными липидными компонентами. В дополнительном варианте осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, и ПЭГ-липид необязательно с одним или более дополнительными липидными компонентами. В дополнительном варианте осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, и катионный липид необязательно с одним или более дополнительными липидными компонентами. В дополнительном варианте осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, и анионный липид необязательно с одним или более дополнительными липидными компонентами. В субварианте осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, хелперный липид и ПЭГ-липид необязательно с нейтральным липидом. В дополнительном субварианте осуществления липидная композиция содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, хелперный липид, ПЭГ-липид и нейтральный липид.

Композиции, содержащие липиды формулы (I) или формулы (II), или их фармацевтически приемлемые соли, или их липидные композиции могут быть в различных формах, включая, но не ограничиваясь ими, средства доставки, образующие частицы, включая микрочастицы, наночастицы и трансфекционные агенты, которые полезны для доставки к клеткам различных молекул. Специфические композиции эффективны при трансфекции или доставке биологически активных агентов. Предпочтительные биологически активные агенты представляют собой РНК и ДНК. В дополнительных вариантах осуществления биологически активный агент выбирают из мРНК, гРНК и ДНК. В определенных вариантах осуществления груз содержит мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, Cas-нуклеазу, Cas-нуклеазу класса 2 или Cas9), и гРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую гРНК, или комбинацию мРНК и гРНК.

Типичные соединения формулы (I) для использования в вышеуказанных липидных

композициях приведены в примерах. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 1. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 2. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 3. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 4. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 5. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 6. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 7. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 8. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 9. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 10. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 11. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 12. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 13. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 14. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 15. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 16. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 17. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 20. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 21. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 22. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 23. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 24. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 25. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 27. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 28. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 29. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 30. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 31. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 32. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 33. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 34. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой

соединение 35. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 36. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 37. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 38. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 39. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 40. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 41. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 42. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 43. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 44. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 45. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 46. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 47. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 48. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 49. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение 50. В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой соединение, выбранное из соединений, приведенных в таблице 1, при условии, что указанное соединение не является соединением 18, соединением 19 или соединением 26.

Композиции LNP

Липидные композиции могут быть представлены в виде композиций LNP. Липидные наночастицы могут представлять собой, например, микросферы (включая однослойные и многослойные везикулы, например, «липосомы» - липидные бислои с ламеллярной фазой, которые в некоторых вариантах осуществления являются по существу сферическими и в более конкретных вариантах осуществления могут содержать водное ядро, например, содержащее значительную часть молекул РНК), дисперсную фазу в эмульсии, мицеллы или дисперсную фазу в суспензии.

LNP имеют размер от около 1 до около 1000 нм, от около 10 до около 500 нм, от около 20 до около 500 нм, в субварианте осуществления от около 50 до около 400 нм, в суб-варианте осуществления от около 50 до около 300 нм, в субварианте осуществления от около 50 до около 200 нм, и в субварианте осуществления от около 50 до около 150 нм, и в другом субварианте осуществления от около 60 до около 120 нм. Предпочтительно LNP имеют размер от около 60 нм до около 100 нм. Средние размеры (диаметры) полностью сформированной LNP могут быть измерены с помощью динамического рассеяния света на Malvern Zetasizer. Образец LNP разбавляют в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), так что скорость счета составляет приблизительно 200-400 килоимпульсов в секунду. Данные представлены в виде средневзвешенного значения измерения

интенсивности.

Варианты осуществления настоящего раскрытия обеспечивают липидные композиции, описанные на основании соответствующих молярных соотношений липидных компонентов в композиции. Все числа мол.% приведены в виде доли липидного компонента липидной композиции или, более конкретно, композиций LNP. В определенных вариантах осуществления мол.% соединения формулы (I) или формулы (II) может составлять от около 30 мол.% до около 70 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% соединения формулы (I) или формулы (II) может составлять по меньшей мере 30 мол.%, по меньшей мере 40 мол.%, по меньшей мере 50 мол.% или по меньшей мере 60 мол.%.

В определенных вариантах осуществления мол.% нейтрального липида может составлять от около 0 мол.% до около 30 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% нейтрального липида может составлять от около 0 мол.% до около 20 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% нейтрального липида может составлять около 9 мол.%.

В определенных вариантах осуществления мол.% хелперного липида может составлять от около 0 мол.% до около 80 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% хелперного липида может составлять от около 20 мол.% до около 60 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% хелперного липида может составлять от около 30 мол.% до около 50 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% хелперного липида может составлять от около 30 мол.% до около 40 мол.% или от около 35% мол.% до около 45 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% хелперного липида регулируют на основе концентраций соединения формулы (I) или формулы (II), нейтрального липида и/или ПЭГ-липида, чтобы довести липидный компонент до 100 мол.%.

В определенных вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липида может составлять от около 1 мол.% до около 10 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липида может составлять от около 1 мол.% до около 4 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липида может составлять от около 1 мол.% до около 2 мол.%. В определенных вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липида может составлять около 1,5 мол.%.

В различных вариантах осуществления композиция LNP содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его соль (например, его фармацевтически приемлемую соль (например, как раскрыто в данном документе)), нейтральный липид (например, DSPC), хелперный липид (например, холестерин) и ПЭГ-липид (например, ПЭГ2k-ДМГ). В некоторых вариантах осуществления композиция LNP содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль (например, как раскрыто в данном документе), DSPC, холестерин и ПЭГ-липид. В некоторых таких вариантах осуществления композиция LNP содержит ПЭГ-липид, содержащий ДМГ, например, ПЭГ2k-ДМГ. В определенных предпочтительных вариантах осуществления композиция

LNP содержит соединение формулы (I) или формулы (II), или его фармацевтически приемлемую соль, холестерин, DSPC и ПЭГ2k-ДМГ.

В определенных вариантах осуществления липидные композиции, такие как композиции LNP, содержат липидный компонент и компонент нуклеиновой кислоты, например, РНК-компонент, и молярное соотношение соединения формулы (I) или формулы (II) к нуклеиновой кислоте может быть измерено. Варианты осуществления настоящего раскрытия также предоставляют липидные композиции, имеющие определенное молярное соотношение между положительно заряженными аминогруппами фармацевтически приемлемых солей соединений формулы (I) или формулы (II) (N) и отрицательно заряженными фосфатными группами (P) нуклеиновой кислоты, подлежащей инкапсулированию. Математически это может быть представлено соотношением N/P. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция, такая как композиция LNP, может содержать липидный компонент, который включает в себя соединение формулы (I) или формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль; и компонент нуклеиновой кислоты, где соотношение N/P составляет от около 3 до 10. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать липидный компонент, который включает в себя соединение формулы (I) или формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль; и РНК-компонент, где отношение N/P составляет от около 3 до 10. Например, соотношение N/P может составлять около 4-7. В альтернативном варианте соотношение N/P может составлять около 6, например, 6 ± 1 или 6 ± 0,5.

В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит биологически активный агент. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит полипептид необязательно в комбинации с нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит нуклеиновую кислоту, такую как РНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент представляет собой компонент нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления компонент нуклеиновой кислоты содержит ДНК, и его можно назвать ДНК-компонентом. В некоторых вариантах осуществления компонент нуклеиновой кислоты содержит РНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент, такой как РНК-компонент, может содержать мРНК, например, мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу. В определенных вариантах осуществления водный компонент может содержать мРНК, которая кодирует Cas9. В определенных вариантах осуществления водный компонент может содержать гРНК. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, композиция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту гРНК, такую как гРНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит мРНК Cas-нуклеазы и гРНК. В некоторых вариантах осуществления водный компонент содержит мРНК Cas-нуклеазы класса 2 и гРНК.

В определенных вариантах осуществления липидная композиция, такая как композиция LNP, может содержать мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, соединение формулы (I) или формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, хелперный липид, необязательно нейтральный липид и ПЭГ-липид. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, хелперный липид представляет собой холестерин. В других композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительные вариантах осуществления, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, например, Cas9, ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2k-ДМГ. В конкретных композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, и соединение формулы (I) или формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль. В определенных композициях композиция дополнительно содержит гРНК, такую как дгРНК или огРНК.

В некоторых вариантах осуществления липидная композиция, такая как композиция LNP, может содержать гРНК. В определенных вариантах осуществления композиция может содержать соединение формулы (I) или формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, гРНК, хелперный липид, необязательно нейтральный липид и ПЭГ-липид. В некоторых композициях LNP, содержащих гРНК, хелперный липид представляет собой холестерин. В некоторых композициях, содержащих гРНК, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих гРНК, ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2k-ДМГ. В определенных композициях гРНК выбирают из дгРНК и огРНК.

В определенных вариантах осуществления липидная композиция, такая как композиция LNP, содержит мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и гРНК, которая может быть огРНК, в водном компоненте, и соединение формулы (I) или формулы (II) в липидном компоненте. Например, композиция LNP может содержать соединение формулы (I) или формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, гРНК, хелперный липид, нейтральный липид и ПЭГ-липид. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, хелперный липид представляет собой холестерин. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2k-ДМГ.

В определенных вариантах осуществления липидные композиции, такие как композиции LNP, содержат РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как мРНК Cas класса 2, и по меньшей мере одну гРНК. В определенных вариантах осуществления композиция LNP включает в себя соотношение гРНК и мРНК РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такой как мРНК Cas-нуклеазы класса 2, равное

около 1:1 или около 1:2. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет от около 25:1 до около 1:25, от около 10:1 до около 1:10, от около 8:1 до около 1:8, от около 4:1 до около 1:4 или от около 2:1 до около 1:2.

Липидные композиции, раскрытые в данном документе, такие как композиции LNP, могут включать в себя матричную нуклеиновую кислоту, например, матрицу ДНК. Матричная нуклеиновая кислота может доставляться вместе с липидными композициями, содержащими соединение формулы (I) или формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, или отдельно от них, в том числе в виде композиций LNP. В некоторых вариантах осуществления матричная нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной в зависимости от желаемого механизма репарации. Матрица может иметь области гомологии с целевой ДНК, например, в последовательности ДНК-мишени и/или в последовательностях, примыкающих к ДНК-мишени.

В некоторых вариантах осуществления LNP получают путем смешивания водного раствора РНК с раствором липида на основе органического растворителя. Подходящие растворы или растворители включают в себя или могут содержать: воду, ФСБ, Трис-буфер, NaCl, цитратный буфер, ацетатный буфер, этанол, хлороформ, диэтиловый эфир, циклогексан, тетрагидрофуран, метанол, изопропанол. Например, органическим растворителем может быть 100% этанол. Можно использовать фармацевтически приемлемый буфер, *например*, для введения LNP in vivo . В определенных вариантах осуществления буфер используется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, на уровне pH 6,5 или выше. В определенных вариантах осуществления буфер используется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, на уровне pH 7,0 или выше. В определенных вариантах осуществления композиция имеет pH в диапазоне от около 7,2 до около 7,7. В дополнительных вариантах осуществления композиция имеет pH в диапазоне от около 7,3 до около 7,7 или в диапазоне от около 7,4 до около 7,6. В дополнительных вариантах осуществления композиция имеет pH около 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 или 7,7. pH композиции может быть измерен с помощью микродетектора pH. В определенных вариантах осуществления в композицию включают криопротектор. Неограничивающие примеры криопротекторов включают в себя сахарозу, трегалозу, глицерин, ДМСО и этиленгликоль. Иллюстративные композиции могут содержать до 10% криопротектора, такого как, например, сахароза. В определенных вариантах осуществления композиция может содержать трис-буферизированный физраствор сахарозы (TSS). В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% криопротектора. В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% сахарозы. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может содержать фосфатный буфер (ФСБ), Трис-буфер, цитратный буфер и их смеси. В определенных иллюстративных вариантах осуществления буфер содержит NaCl. В определенных вариантах осуществления буфер не содержит NaCl. Иллюстративные количества NaCl могут

варьироваться от около 20 мМ до около 45 мМ. Иллюстративные количества NaCl могут варьироваться от около 40 мМ до около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления количество NaCl составляет около 45 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой Трис-буфер. Иллюстративные количества Трис могут варьироваться от около 20 мМ до около 60 мМ. Иллюстративные количества Трис могут варьироваться от около 40 мМ до около 60 мМ. В некоторых вариантах осуществления количество Трис составляет около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит NaCl и Трис. Некоторые иллюстративные варианты осуществления композиций LNP содержат 5% сахарозы и 45 мМ NaCl в Трис-буфере. В других иллюстративных вариантах осуществления композиции содержат сахарозу в количестве около 5% мас./об., около 45 мМ NaCl и около 50 мМ Трис при pH 7,5. Количество соли, буфера и криопротектора может варьироваться таким образом, чтобы поддерживать осмоляльность всей композиции. Например, конечная осмоляльность может поддерживаться на уровне менее 450 мОсм/л. В дополнительных вариантах осуществления осмоляльность составляет от 350 до 250 мОсм/л. Определенные варианты осуществления имеют конечную осмоляльность 300 +/- 20 мОсм/л или 310 +/- 40 мОсм/л.

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

LNP могут представлять собой, *например*, микросферы (включая однослойные и многослойные везикулы, *например*, «липосомы» - липидные бислои с ламеллярной фазой, которые в некоторых вариантах осуществления являются по существу сферическими - и в более конкретных вариантах осуществления могут содержать водное ядро, *например*, содержащее значительную часть молекул РНК), дисперсную фазу в эмульсии, мицеллы или дисперсную фазу в суспензии.

Предпочтительные липидные композиции, такие как композиции LNP, являются биоразлагаемыми, поскольку они не накапливаются до цитотоксических уровней in vivo при терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления

композиции не вызывают врожденный иммунный ответ, который приводит к существенным побочным эффектам при уровне терапевтической дозы. В некоторых вариантах осуществления композиции, предложенные в данном документе, не вызывают токсичности при уровне терапевтической дозы.

В некоторых вариантах осуществления LNP, раскрытые в данном документе, имеют индекс полидисперсности (PDI), который может варьироваться в пределах от около 0,005 до около 0,75. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет PDI, который может варьироваться от около 0,01 до около 0,5. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет PDI, который может варьироваться от около нуля до около 0,4. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет PDI, который может варьироваться от около нуля до около 0,35. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет PDI, который может варьироваться от около нуля до около 0,35. В некоторых вариантах осуществления PDI LNP может варьироваться от около нуля до около 0,3. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет PDI, который может варьироваться от около нуля до около 0,25. В некоторых вариантах осуществления PDI LNP может варьироваться от около нуля до около 0,2. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет PDI, который может составлять менее чем около 0,08, 0,1, 0,15, 0,2 или 0,4.

Раскрытые здесь LNP имеют размер (*например*, Z-средний диаметр) от около 1 до около 250 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 10 до около 200 нм. В дополнительных вариантах осуществления LNP имеют размер от около 20 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 50 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 50 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 50 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 60 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 75 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 75 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 75 до около 100 нм. Если не указано иное, все размеры, упомянутые в данном документе, представляют собой средние размеры (диаметры) полностью сформированных наночастиц, измеренные путем динамического рассеяния света на Malvern Zetasizer. Образец наночастиц разбавляют в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), так что скорость счета составляет приблизительно 200-400 килоимпульсов в секунду. Данные представлены в виде средневзвешенного показателя интенсивности (Z-средний диаметр).

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

осуществления LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 75% до около 95%.

Груз

Груз, доставляемый с помощью композиции LNP, может представлять собой биологически активный агент. В некоторых вариантах осуществления груз представляет собой или содержит один или более биологически активных агентов, таких как мРНК, гидовая РНК, нуклеиновая кислота, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, вектор экспрессии, матричная нуклеиновая кислота, антитело (например, моноклональное, химерное, гуманизированное, нанотело и их фрагменты и т. д.), холестерин, гормон, пептид, белок, химиотерапевтические и другие типы противоопухолевых агентов, низкомолекулярные лекарственные средства, витамины, кофакторы, нуклеозиды, нуклеотиды, олигонуклеотиды, ферментативные нуклеиновые кислоты, антисмысловые нуклеиновые кислоты, триплекс-образующий олигонуклеотид, антисмысловую ДНК или композицию РНК, композицию химерная ДНК:РНК, аллозим, аптамер, рибозим, ловушки и их аналоги, плазмиду и другие типы векторов, а также малую молекулу нуклеиновой кислоты, агент РНКи, короткую интерферирующую нуклеиновую кислоту (киНК), короткую интерферирующую РНК (киРНК), двухцепочечную РНК (дцРНК), микро-РНК (miРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК) и молекулы «самореплицирующейся РНК» (кодирующей активность фермента репликазы и способной управлять собственной репликацией или амплификацией in vivo), пептидную нуклеиновую кислоту (ПНК), рибонуклеотид заблокированной нуклеиновой кислоты (LNA), морфолиновый нуклеотид, нуклеиновую кислоту треозы (TNA), гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), sisiРНК (короткую внутренне сегментированную интерферирующую РНК) и iРНК (асимметричную интерферирующую РНК). Приведенный выше список биологически активных агентов является только иллюстративным и не предназначен для ограничения. Такие соединения могут быть очищены или частично очищены, могут иметь природное происхождение или быть синтетическими и могут быть химически модифицированными.

Груз, доставляемый с помощью композиции LNP, может представлять собой РНК, такую как молекула мРНК, кодирующая представляющий интерес белок. Например, включена мРНК для экспрессии белка, такого как зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или Cas-нуклеаза. Предложены композиции LNP, которые содержат мРНК Cas-нуклеазы, например, мРНК Cas-нуклеазы класса 2, которая обеспечивает экспрессию Cas-нуклеазы класса 2, такой как белок Cas9 или Cpf1, в клетке. Кроме того, груз может содержать одну или более гидовых РНК или нуклеиновых кислот, кодирующих гидовые РНК. Матричная нуклеиновая кислота, *например*, для репарации или рекомбинации, также может быть включена в композицию, или матричная нуклеиновая кислота может быть использована в описанных в данном документе способах. В субварианте осуществления груз содержит мРНК, которая кодирует Cas9 Streptococcus pyogenes, а также необязательно гРНК S. pyogenes. В дополнительном субварианте осуществления груз содержит мРНК, которая кодирует Cas9 Neisseria

meningitidis, а также необязательно гРНК nme.

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

Груз CRISPR/Cas

В некоторых вариантах осуществления раскрытые композиции содержат мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза. В конкретных вариантах осуществления раскрытые композиции содержат мРНК, кодирующую нуклеазу Cas класса 2, такую как Cas9 S. pyogenes.

Используемый в данном документе термин «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, причем активность связывания ДНК специфична для последовательности и зависит от последовательности РНК. Иллюстративные РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают в себя Cas-клевазы/никазы и их инактивированные формы («ДНК-связывающие агенты dCas»). Термин «Cas-нуклеаза», используемый в данном документе, охватывает Cas-клевазы, Cas-никазы и ДНК-связывающие агенты dCas. Cas-клевазы/никазы и ДНК-связывающие агенты dCas включают в себя комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и Cas-нуклеазы класса 2. Используемый в данном документе термин «Cas-нуклеаза класса 2» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой активностью связывания ДНК. Cas-нуклеазы класса 2 включают в себя Cas-клевазы/никазы класса 2 (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают РНК-направляемой клевазной или никазной активностью в отношении ДНК, и ДНК-связывающие агенты dCas класса 2, в которых активность клевазы/никазы инактивируется. Cas-нуклеазы класса 2 включают в себя, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (например, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки во всей их полноте.

См., *например*, Zetsche, таблицы S1 и S3. См., *например*, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

Используемый в данном документе термин «рибонуклеопротеин» (РНП) или «комплекс РНП» относится к гидовой РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas-нуклеаза, например, Cas-клеваза, Cas-никаза или ДНК-связывающий агент dCas (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к целевой последовательности, гидовая РНК гибридизируется с целевой последовательностью, а агент связывается с ней; в случаях, когда агент представляет собой клевазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или никование.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения груз для композиции LNP включает в себя по меньшей мере одну гидовую РНК, содержащую направляющие последовательности, которые направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может быть нуклеазой (например, Cas-нуклеазой, такой как Cas9), к целевой ДНК. гРНК может направлять Cas-нуклеазу или Cas-нуклеазу класса 2 к целевой последовательности на молекуле целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гРНК связывается и обеспечивает специфичность расщепления с помощью Cas-нуклеазы класса 2. В некоторых вариантах осуществления гРНК и Cas-нуклеаза могут образовывать рибонуклеопротеид (РНП), *например*, комплекс CRISPR/Cas, такой как комплекс CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas9 типа II. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas типа V, такой как комплекс Cpf1/гидовая РНК. Cas-нуклеазы и родственные гРНК могут быть спарены. Каркасные структуры гРНК, которые связываются с каждой Cas-нуклеазой класса 2, варьируются в зависимости от конкретной системы CRISPR/Cas.

Термины «гидовая РНК», «гРНК» и просто «гид» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения crРНК (также известной как РНК CRISPR) или комбинации crРНК и trРНК (также известной как tracrРНК). Гидовые РНК могут включать в себя модифицированные РНК, как описано в данном документе. crРНК и trРНК могут быть связаны в виде одиночной молекулы РНК (одиночная гидовая РНК, огРНК) или в виде двух отдельных молекул РНК (двойная гидовая РНК, дгРНК). Термин «гидовая РНК» или «гРНК» относится к каждому типу. trRNA может быть встречающейся в природе последовательностью или последовательностью trRNA с модификациями или вариациями по сравнению с встречающимися в природе последовательностями.

Используемый в данном документе термин «гидовая последовательность» относится к последовательности в гидовой РНК, которая является комплементарной целевой последовательности и функционирует для направления гидовой РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (*например*, расщепления) РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. «Гидовая последовательность» может также

упоминаться как «нацеливающая последовательность» или «спейсерная последовательность». Гидовая последовательность может иметь длину 20 пар оснований, *например*, в случае Streptococcus pyogenes (*то есть* Spy Cas9) и родственных гомологов/ортологов Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут быть использованы в качестве гидов, *например*, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность, например, находится в гене или в хромосоме и является комплементарной гидовой последовательности. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или идентичности между гидовой последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около или по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными в области по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов. В других вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, гидовая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадения, когда гидовая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, когда гидовая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

Целевые последовательности для РНК-направляемых ДНК-связывающих белков, таких как белки Cas, включают в себя как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (*то есть* заданную последовательность и обратный комплемент последовательности), поскольку субстрат нуклеиновой кислоты для белка Cas представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Соответственно, когда говорят, что гидовая последовательность является «комплементарной целевой последовательности», следует понимать, что гидовая последовательность может направлять гидовую РНК для связывания с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, где гидовая последовательность связывает обратный комплемент целевой последовательности, гидовая последовательность идентична некоторым нуклеотидам целевой последовательности (*например*, целевой последовательности, не включая PAM), за исключением замены U на T в гидовой последовательности.

Длина целевой последовательности может зависеть от системы CRISPR/Cas и используемых компонентов. Например, разные Cas-нуклеазы класса 2 из разных видов бактерий имеют различные оптимальные длины нацеливающих последовательностей. Соответственно, длина нацеливающей последовательности может составлять 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина нацеливающей последовательности на 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов больше или меньше, чем длина гидовой последовательности встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. В определенных вариантах осуществления каркас Cas-нуклеазы и гРНК будет происходить из одной и той же системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 18-24 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 19-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 20 нуклеотидов.

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

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

Модифицированные РНК

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

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

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать в себя один или более из следующего: (i) изменение, *например*, замена одного или обоих не связывающих

фосфатных атомов кислорода и/или одного или более связывающих фосфатных атомов кислорода в фосфодиэфирной связи остова (иллюстративная модификация остова); (ii) изменение, *например*, замена компонента рибозного сахара, *например*, 2'-гидроксила на рибозном сахаре (иллюстративная модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента «дефосфо» линкерами (иллюстративная модификация остова); (iv) модификация или замена встречающегося в природе нуклеинового основания, в том числе неканоническим нуклеиновым основанием (иллюстративная модификация основания); (v) замена или модификация рибозофосфатного остова (иллюстративная модификация остова); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, *например*, удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3'- или 5'-кэпа могут включать в себя модификацию сахара и/или остова); и (vii) модификация или замена сахара (иллюстративная модификация сахара). Определенные варианты осуществления включают в себя модификацию на 5'-конце мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Определенные варианты осуществления включают в себя модификацию на 3'-конце мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Модифицированная РНК может содержать модификации на 5'-конце и 3'-конце. Модифицированная РНК может содержать один или более модифицированных остатков в неконцевых положениях. В определенных вариантах осуществления гРНК содержит по меньшей мере один модифицированный остаток. В определенных вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере один модифицированный остаток.

Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены деградации, *например*, внутриклеточными нуклеазами или нуклеазами, обнаруженными в сыворотке. Например, нуклеазы могут гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Соответственно, в одном аспекте РНК (например, мРНК, гРНК), описанные в данном документе, могут содержать один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, *например*, для придания стабильности внутриклеточным или сывороточным нуклеазам. В некоторых вариантах осуществления модифицированные молекулы гРНК, описанные в данном документе, могут вызывать пониженный врожденный иммунный ответ при введении в популяцию клеток как in vivo, так и ex vivo. Термин «врожденный иммунный ответ» включает в себя клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который предполагает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, в частности интерферонов, и гибель клеток.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления РНК или нуклеиновая кислота в раскрытых композициях LNP содержит по меньшей мере одну модификацию, которая придает усиленную или повышенную стабильность нуклеиновой кислоте, включая, например, повышенную устойчивость к расщеплению нуклеазами in vivo. Используемые в данном документе термины «модификация» и «модифицированный», поскольку такие термины относятся к нуклеиновым кислотам, представленным в данном документе, включают в себя по меньшей мере одно изменение, которое предпочтительно

повышает стабильность и делает РНК или нуклеиновую кислоту более стабильной (например, устойчивой к расщеплению нуклеазами) по сравнению с версией РНК или нуклеиновой кислоты дикого типа или природного происхождения. Используемые в данном документе термины «стабильный» и «стабильность», поскольку такие термины относятся к нуклеиновым кислотам по настоящему изобретению и, в частности, к РНК, относятся к усиленной или повышенной устойчивости к разрушению, например, нуклеазами (т.е. эндонуклеазами или экзонуклеазами), которые обычно способны разрушать такую РНК. Повышенная стабильность может включать в себя, например, меньшую чувствительность к гидролизу или другому разрушению эндогенными ферментами (например, эндонуклеазами или экзонуклеазами) или условиям внутри клетки-мишени или ткани-мишени, тем самым увеличивая или усиливая пребывание такой РНК в клетке-мишени, ткани-мишени, субъекте и/или цитоплазме. Стабилизированные молекулы РНК, представленные в данном документе, демонстрируют более длительный период полураспада по сравнению с их встречающимися в природе немодифицированными аналогами (например, версия мРНК дикого типа). Также под терминами «модификация» и «модифицированный», поскольку такие термины относятся к мРНК композиций LNP, раскрытых в данном документе, подразумеваются изменения, которые улучшают или усиливают трансляцию нуклеиновых кислот мРНК, включая, например, включение последовательностей, которые действуют при инициации трансляции белка (например, консенсусная последовательность Kozac). (Kozak, M., Nucleic Acids Res 15 (20): 8125-48 (1987)).

В некоторых вариантах осуществления РНК или нуклеиновая кислота раскрытых в данном документе композиций LNP претерпела химическую или биологическую модификацию, чтобы сделать ее более стабильной. Иллюстративные примеры модификаций РНК включают в себя вытеснение основания (например, путем делеции или замены одного нуклеотида на другой) или модификацию основания, например, химическую модификацию основания. Фраза «химические модификации», используемая в данном документе, включает в себя модификации, которые вводят химические вещества, отличающиеся от таковых в РНК природного происхождения, например, ковалентные модификации, такие как введение модифицированных нуклеотидов (например, аналогов нуклеотидов или включение боковых групп, которые не встречаются в природе в таких молекулах РНК).

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

заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

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

мРНК

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

мРНК в раскрытых композициях LNP может кодировать, например, секретируемый гормон, фермент, рецептор, полипептид, пептид или другой представляющий интерес белок, который обычно секретируется. В одном варианте осуществления изобретения мРНК может необязательно иметь химические или биологические модификации, которые, например, повышают стабильность и/или увеличивают период полураспада такой мРНК или которые улучшают или иным образом облегчают выработку белка.

Кроме того, подходящие модификации включают в себя изменения в одном или более нуклеотидах кодона, так что кодон кодирует ту же аминокислоту, но является более

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

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

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

Считается, что поли-A-хвост стабилизирует природные мессенджеры. Следовательно, в одном варианте осуществления длинный поли-A-хвост может быть добавлен к молекуле мРНК, что делает мРНК более стабильной. Поли-A-хвосты могут быть добавлены с использованием различных методов, известных в данной области техники. Например, длинные поли-A-хвосты могут быть добавлены к синтетической или транскрибируемой in vitro мРНК с использованием поли-A-полимеразы (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Вектор транскрипции также может кодировать

длинные поли-А-хвосты. Кроме того, поли-А-хвосты могут быть добавлены путем транскрипции непосредственно из продуктов ПЦР. В одном варианте осуществления длина поли-А-хвоста составляет по меньшей мере около 90, 200, 300, 400, по меньшей мере 500 нуклеотидов. В одном варианте осуществления длину поли-А-хвоста регулируют для контроля стабильности модифицированной молекулы мРНК по изобретению и, таким образом, транскрипции белка. Например, поскольку длина поли-А-хвоста может влиять на период полураспада молекулы мРНК, длину поли-А-хвоста можно отрегулировать, чтобы изменить уровень устойчивости мРНК к нуклеазам и, таким образом, контролировать динамику экспрессии белка в клетке. В одном варианте осуществления стабилизированные молекулы мРНК являются достаточно устойчивыми к деградации in vivo (например, нуклеазами), так что они могут быть доставлены в клетку-мишень без носителя для переноса.

В одном варианте осуществления мРНК может быть модифицирована путем введения 3’- и/или 5’-нетранслируемых (UTR) последовательностей, не встречающихся в природе в мРНК дикого типа. В одном варианте осуществления 3'- и/или 5'-фланкирующая последовательность, которая в естественных условиях фланкирует мРНК и кодирует второй неродственный белок, может быть введена в нуклеотидную последовательность молекулы мРНК, кодирующей терапевтический или функциональный белок, для ее модификации. Например, 3′ или 5’ последовательности из молекул мРНК, которые являются стабильными (например, глобин, актин, GAPDH, тубулин, гистон или ферменты цикла лимонной кислоты), могут быть включены в 3′ и/или 5’ область молекулы нуклеиновой кислоты смысловой мРНК для повышения стабильности молекулы смысловой мРНК. См., например, US2003/0083272.

Более подробные описания модификаций мРНК можно найти в US2017/0210698A1 на страницах 57-68, содержание которого включено в данный документ.

Матричная нуклеиновая кислота

Композиции и способы, раскрытые в данном документе, могут включать в себя матричную нуклеиновую кислоту. Матрицу можно использовать для изменения или вставки последовательности нуклеиновой кислоты в целевой сайт или рядом с ним для РНК-направляемого ДНК-связывающего белка, такого как Cas-нуклеаза, например, Cas-нуклеаза класса 2. В некоторых вариантах осуществления способы включают в себя введение матрицы в клетку. В некоторых вариантах осуществления может быть предложена одна матрица. В других вариантах осуществления могут быть предложены две или более матриц, так что редактирование может происходить в двух или более целевых сайтах. Например, могут быть предложены разные матрицы для редактирования одного гена в клетке или двух разных генов в клетке.

В некоторых вариантах осуществления матрица может использоваться в гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления гомологичная рекомбинация может приводить к интеграции последовательности матрицы или части последовательности матрицы в молекулу целевой нуклеиновой кислоты. В других

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

В некоторых вариантах осуществления последовательность матрицы может соответствовать, содержать или состоять из эндогенной последовательности клетки-мишени. Она также или альтернативно может соответствовать, содержать или состоять из экзогенной последовательности клетки-мишени. Используемый в данном документе термин «эндогенная последовательность» относится к последовательности, которая является нативной для клетки. Термин «экзогенная последовательность» относится к последовательности, которая не является нативной для клетки, или к последовательности, чье нативное расположение в геноме клетки находится в другом месте. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой геномную последовательность клетки. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой хромосомную или внехромосомную последовательность. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой плазмидную последовательность клетки.

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

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

Соединения или композиции обычно, но не обязательно, включают в себя одно или

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

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

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

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

Определения

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

Если специально не указано в приведенном выше описании, варианты осуществления в описании, которые содержат «содержащие» различные компоненты,

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

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

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

Используемый в данном документе термин «доставка» означает обеспечение наличия объекта в пункте назначения. Например, доставка терапевтического и/или профилактического средства субъекту может включать в себя введение субъекту композиции наночастиц, включая терапевтическое и/или профилактическое средство

(например, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным или подкожным путем). Введение композиции наночастиц млекопитающему или в клетку млекопитающего может включать в себя приведение в контакт одной или более клеток с композицией наночастиц.

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

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

Используемый в данном документе термин «соотношение N/P» представляет собой молярное соотношение ионизируемых (в физиологическом диапазоне pH) атомов азота в липиде и фосфатных групп в РНК, например, в композиции наночастиц, включая липидный компонент и РНК.

Композиции также могут включать в себя соли одного или более соединений. Соли могут быть фармацевтически приемлемыми солями. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным раскрытых соединений, в которых исходное соединение изменено путем преобразования существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму (например, путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают в себя, но не ограничиваются ими, соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; соли щелочей или органических оснований с кислотными остатками, такими как карбоновые кислоты; и тому подобное. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают в себя ацетат, адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат,

этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валератные соли и тому подобное. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают в себя соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению включают в себя обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основный или кислотный фрагмент, с помощью традиционных химических способов. Как правило, такие соли могут быть получены взаимодействием форм этих соединений в виде свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси; как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются предпочтительными. Перечни подходящих солей находятся в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008 и Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

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

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

Термин «алкил», используемый в данном документе, представляет собой разветвленную или неразветвленную насыщенную углеводородную группу из 1-24 атомов углерода, такую как метил, этил, *н*-пропил, изопропил, *н*-бутил, изобутил, *с*-бутил, *т*-бутил, *н*-пентил, изопентил, *с*-пентил, неопентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил, додецил, тетрадецил, гексадецил, эйкозил, тетракозил и т. п. Алкильная группа может быть циклической или ациклической. Алкильная группа может быть разветвленной или неразветвленной (т.е. линейной). Алкильная группа также может быть замещенной или

незамещенной (предпочтительно незамещенной). Например, алкильная группа может быть замещена одной или более группами, включая, но не ограничиваясь этим, алкил, циклоалкил, алкокси, амино, эфир, галогенид, гидрокси, нитро, силил, сульфоксо, сульфонат, карбоксилат или тиол, как описано в данном документе. «Низшая алкильная» группа представляет собой алкильную группу, содержащую от одного до шести (*например*, от одного до четырех) атомов углерода.

Термин «алкенил», используемый в данном документе, относится к алифатической группе, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь, и предназначен для включения как «незамещенных алкенилов», так и «замещенных алкенилов», последние из которых относятся к алкенильным фрагментам, имеющим заместители, заменяющие водород на одном или более атомах углерода алкенильной группы.Такие заместители могут встречаться на одном или более атомах углерода, которые включены или не включены в одну или более двойных связей.Более того, такие заместители включают в себя все заместители, которые предусмотрены для алкильных групп, как обсуждается ниже, за исключением случаев, когда не позволяет стабильность.Например, предполагается, что алкенильная группа может быть замещена одной или более алкильными, карбоциклильными, арильными, гетероциклильными или гетероарильными группами.Иллюстративные алкенильные группы включают в себя, но не ограничиваются ими, винил (-$CH{=}CH_2$), аллил (-$CH_2CH{=}CH_2$), циклопентенил (-C_5H_7) и 5-гексенил (-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH{=}CH_2$).

«Алкиленовая» группа относится к двухвалентному алкильному радикалу, который может быть разветвленным или неразветвленным (т.е. линейным). Любые из вышеуказанных одновалентных алкильных групп могут быть преобразованы в алкилен путем отщепления второго атома водорода от алкила. Типичные алкилены включают в себя $C_{2\text{-}4}$ алкилен и $C_{2\text{-}3}$ алкилен. Типичные алкиленовые группы включают в себя, но не ограничиваются ими,-$CH(CH_3)$-, -$C(CH_3)_2$-, -CH_2CH_2-, -$CH_2CH(CH_3)$-, -$CH_2C(CH_3)_2$-, -$CH_2CH_2CH_2$-, -$CH_2CH_2CH_2CH_2$- и т. п. Алкиленовая группа также может быть замещенной или незамещенной. Например, алкиленовая группа может быть замещена одной или более группами, включая, но не ограничиваясь ими, алкил, арил, гетероарил, циклоалкил, алкокси, амино, простой эфир, галогенид, гидрокси, нитро, силил, сульфоксо, сульфонат, сульфонамид, мочевину, амид, карбамат, сложный эфир, карбоксилат или тиол, как описано в данном документе.

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

Термин «$C_{x\text{-}y}$» при использовании в сочетании с химическим фрагментом, таким

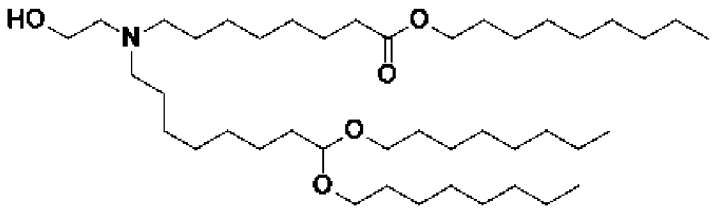
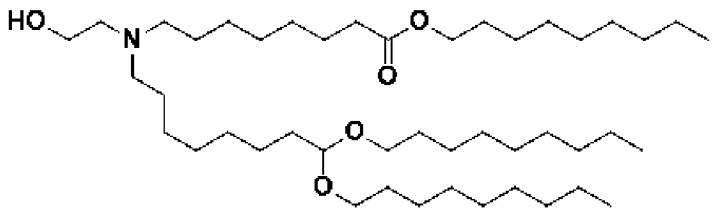
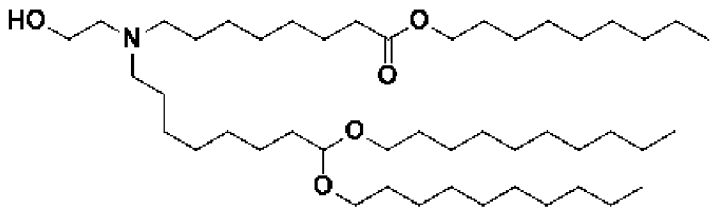
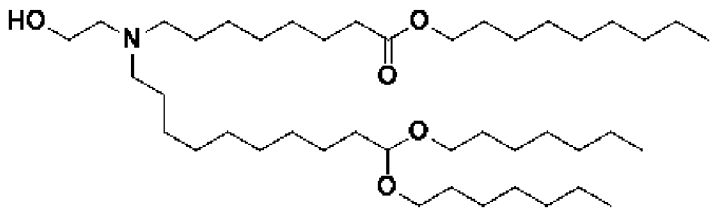
как алкил или алкилен, предназначен для включения групп, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи. Например, термин «C_{x-y} алкил» относится к замещенным или незамещенным насыщенным углеводородным группам, включая алкильные и алкиленовые группы с прямой и разветвленной цепью, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи.

Включение посредством ссылки

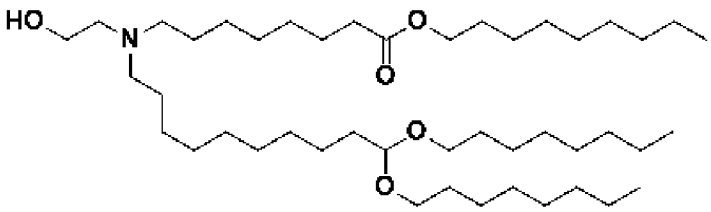
Содержание статей, патентов и патентных заявок, а также всех других документов и доступной в электронном виде информации, упомянутой или цитируемой в данном документе, настоящим включено посредством ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально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

Примеры

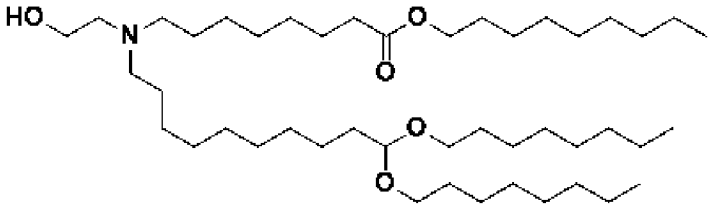
Таблица 1. Соединения

Соединение	**Структура**
1	
2	
3	
4	

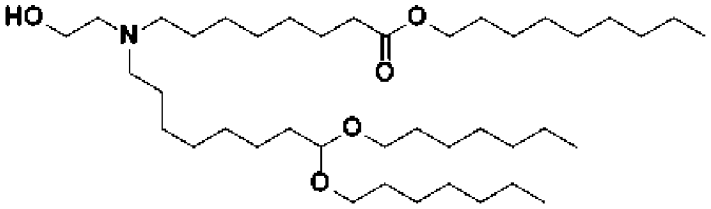
5



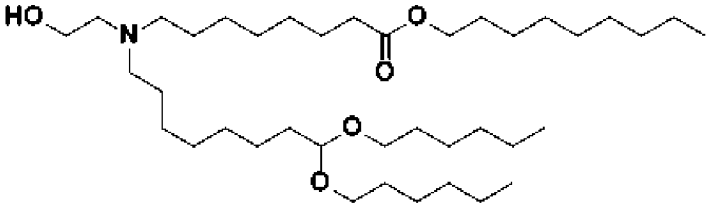
6



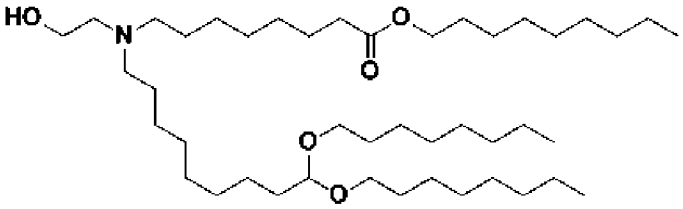
7



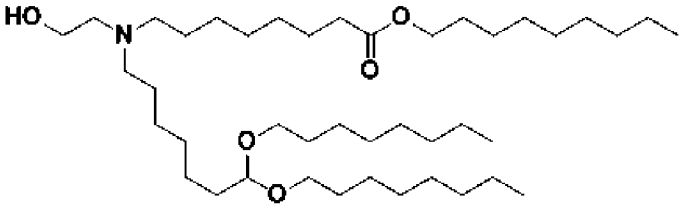
8



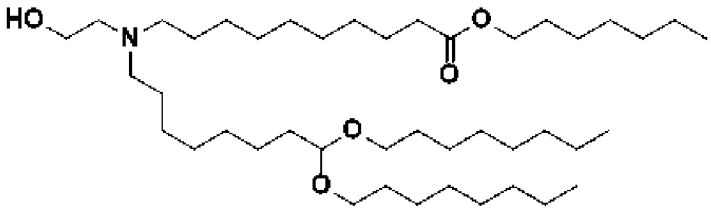
9



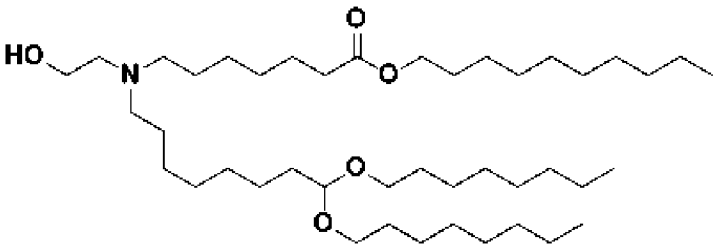
10



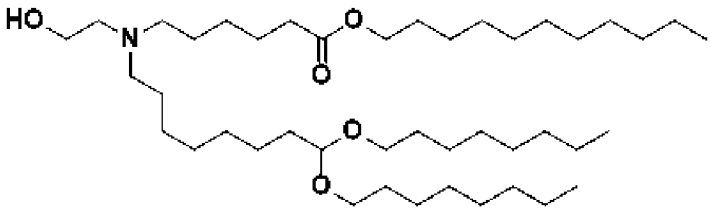
11



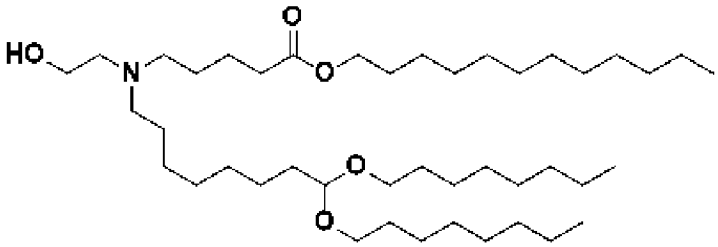
12



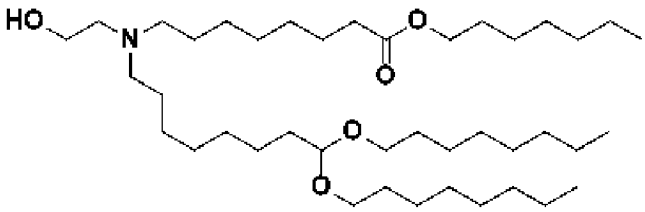
13



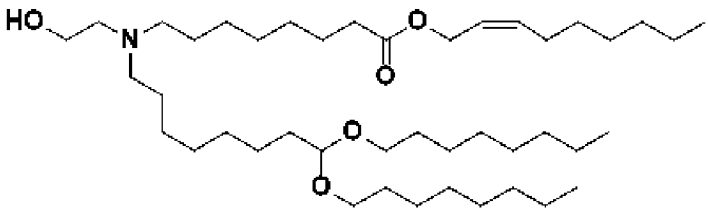
14



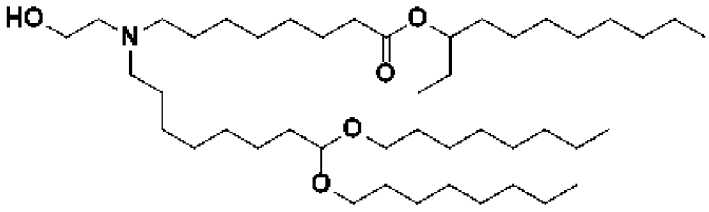
15



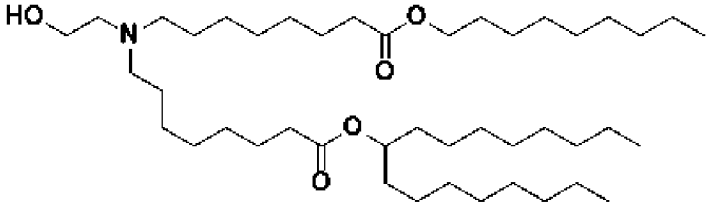
16



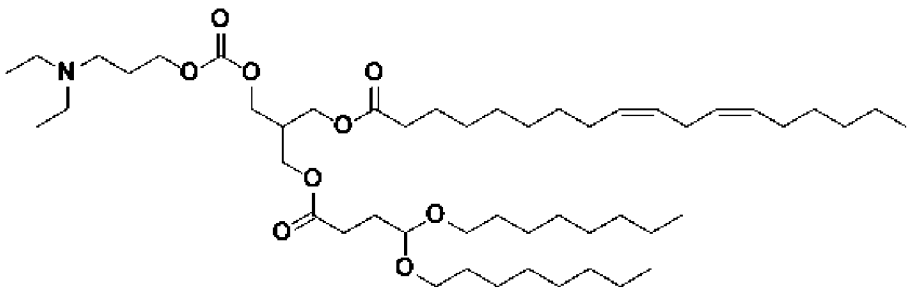
17



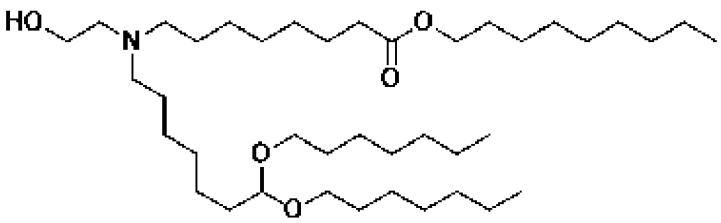
18



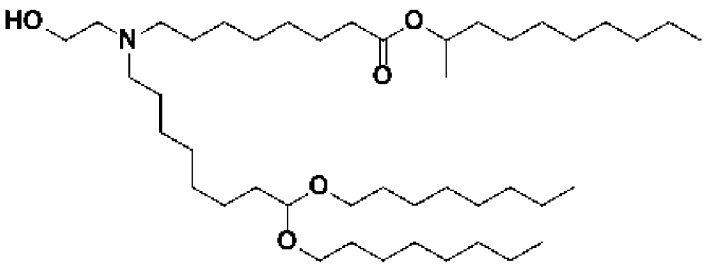
19



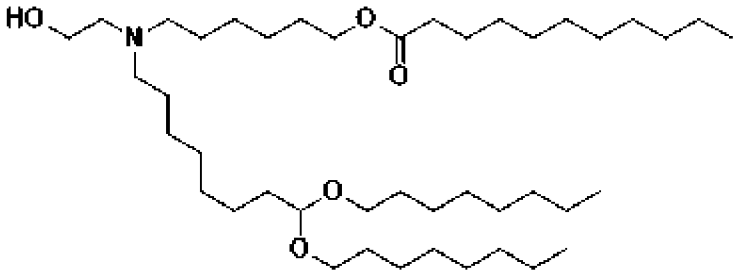
20



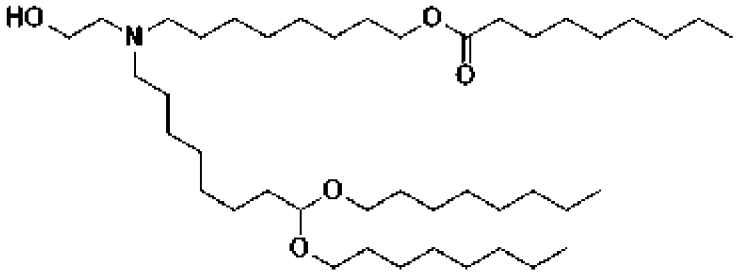
21



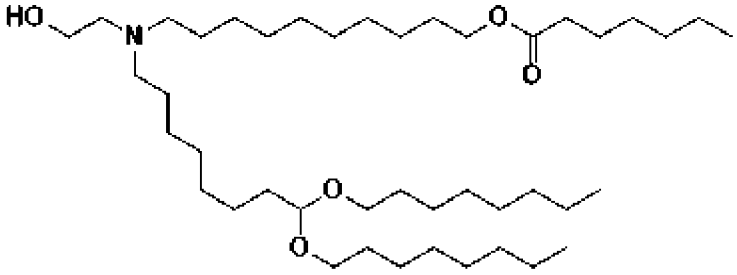
22



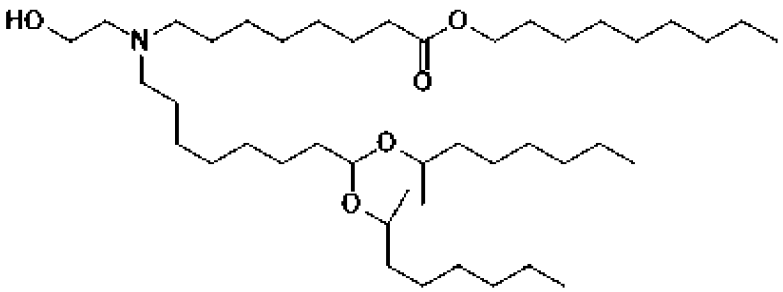
23



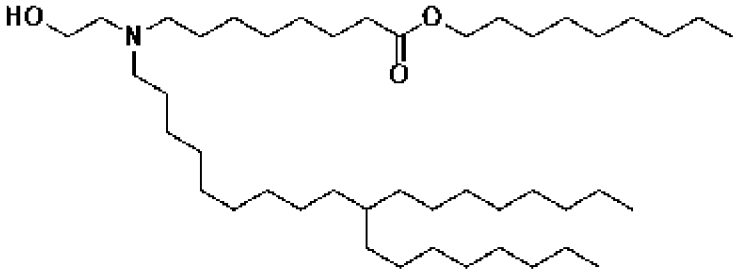
24



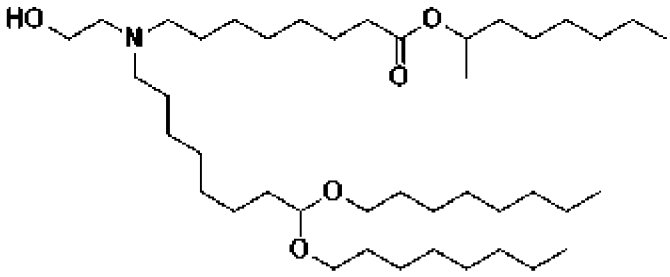
25



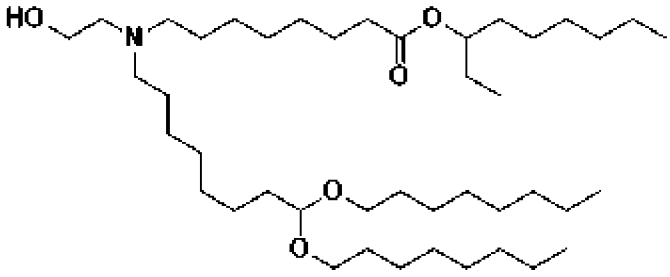
26



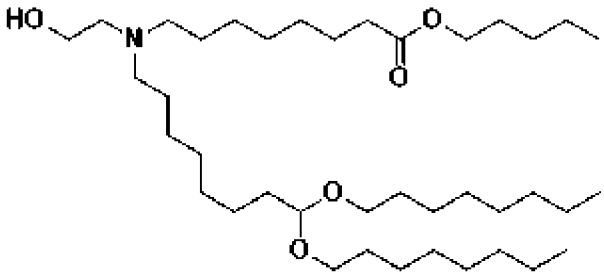
27



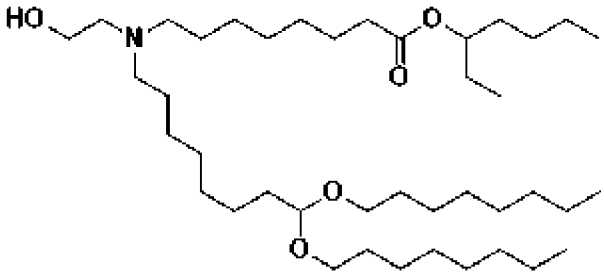
28



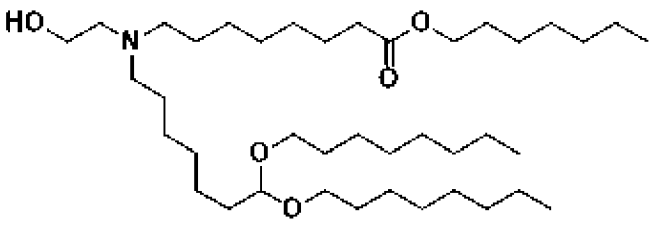
29



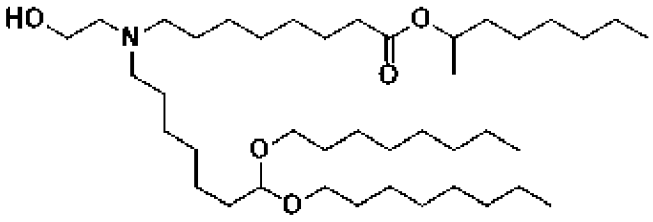
30



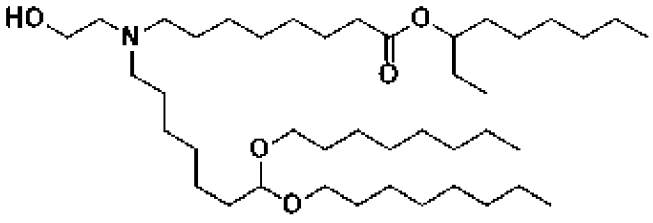
31



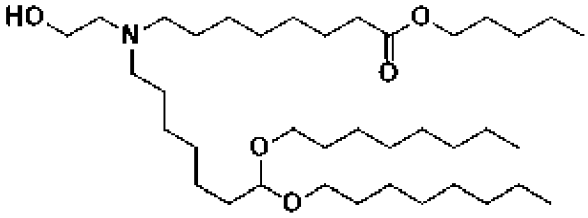
32



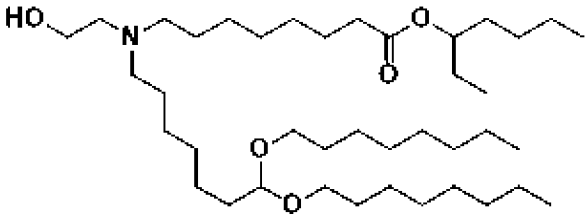
33



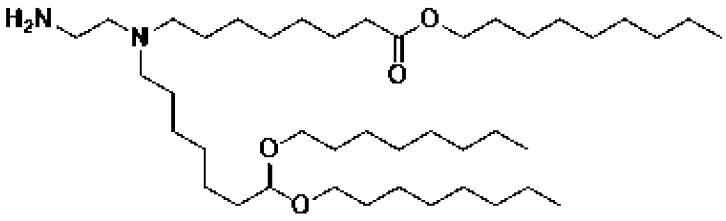
34



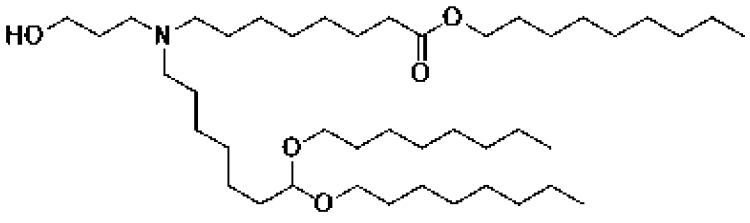
35



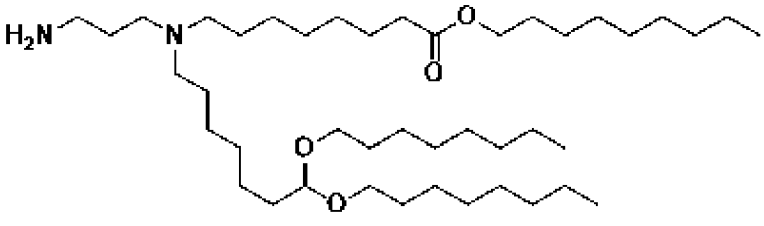
36



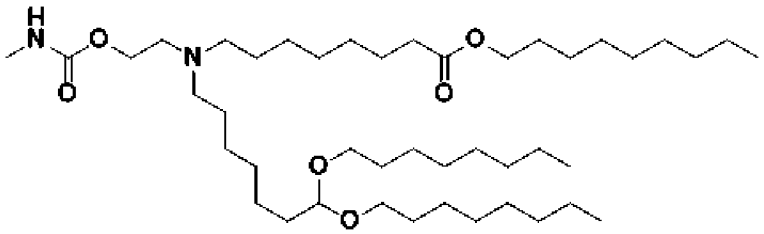
37



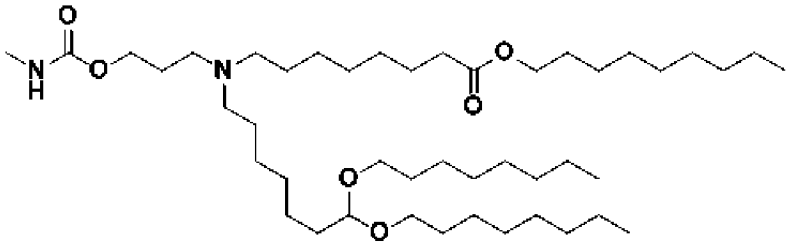
38



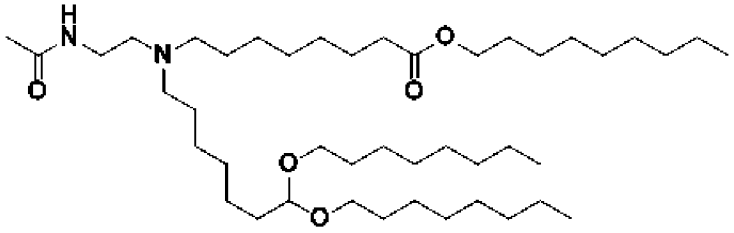
39



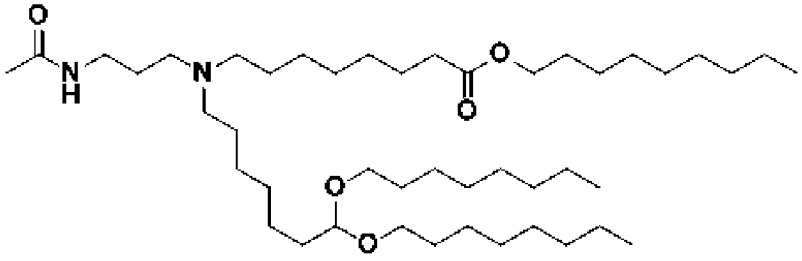
40



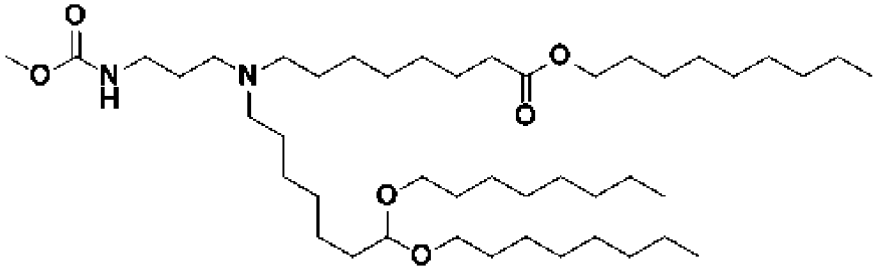
41



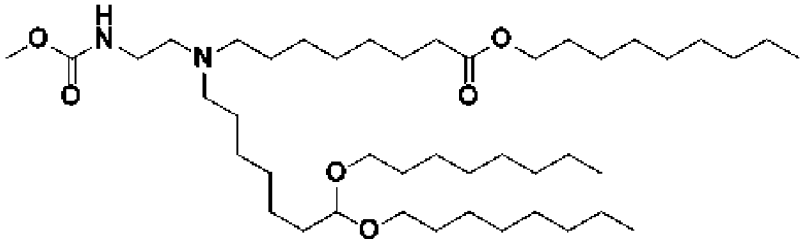
42



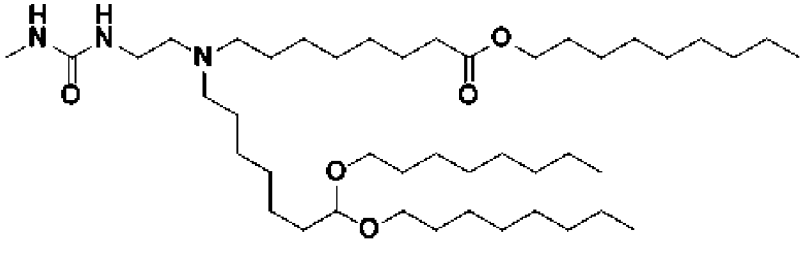
43



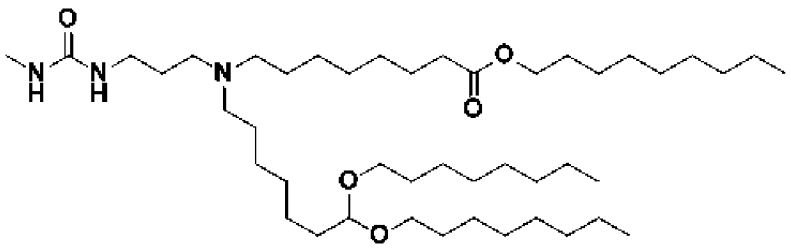
44



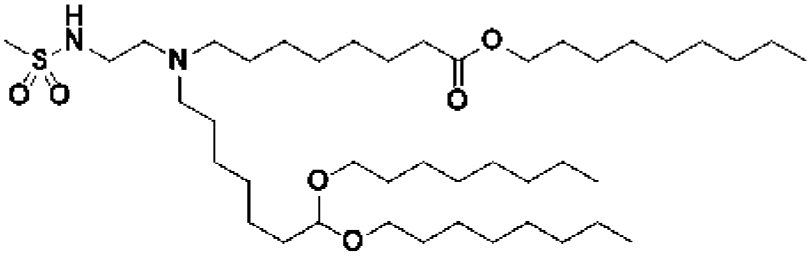
45



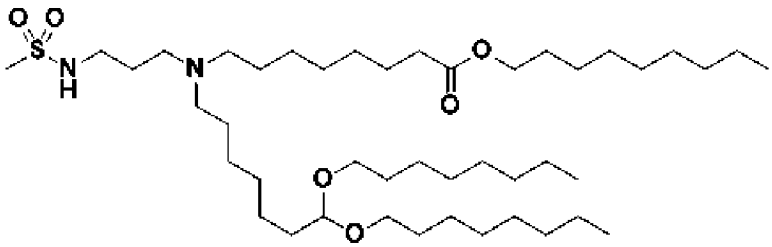
46



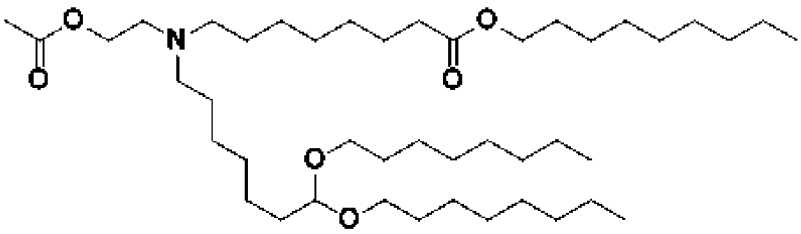
47



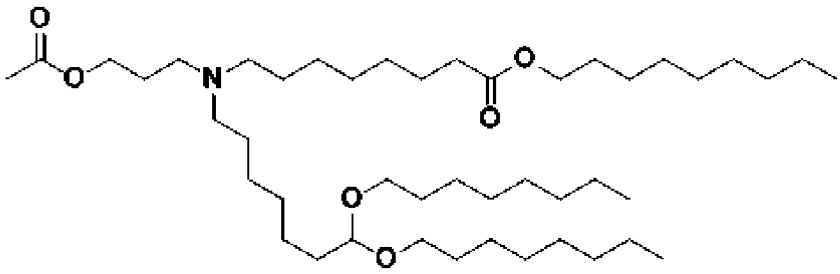
48



49



50



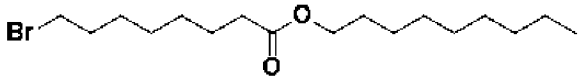
Общая информация

Все реагенты и растворители были приобретены и использованы в том виде, в каком они были получены от коммерческих поставщиков, или синтезированы в соответствии с указанными процедурами. Все промежуточные и конечные соединения очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле. Спектры ЯМР записывали на спектрометре Bruker или Varian 400 МГц, а данные ЯМР собирали в $CDCl_3$ при температуре окружающей среды. Химические сдвиги указаны в миллионных долях (м.д.) относительно $CDCl_3$ (7,26). Данные для ^1H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг, мультиплетность (br=широкий, s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, dd=дублет дублетов, dt=дублет триплетов, m=мультиплет), константа взаимодействия и интегрирование. Данные МС регистрировали на масс-спектрометре Waters SQD2 с источником ионизации электрораспылением (ESI). Чистоту конечных

соединений определяли с помощью СВЭЖХ-МС-ИДС с использованием прибора для жидкостной хроматографии Waters Acquity H-Class, оснащенного масс-спектрометром SQD2 с детекторами фотодиодной матрицы (ФДМ) и испарительного светорассеяния (ИДС).

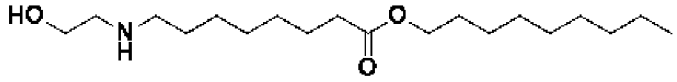
Пример 1 - Соединение 1

Промежуточное соединение 1a: нонил-8-бромоктаноат



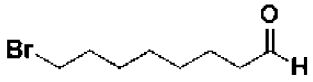
К раствору 8-бромоктановой кислоты (5,0 г, 22,4 ммоль) и нонан-1-ола (1-2 экв.) в ДХМ (56 мл) добавляли DIEA (2-3 экв.), DMAP (0,1-0,25 экв.) и EDC·HCl (1-1,5 экв.) последовательно при 15-25°C в течение по меньшей мере 4 часов. После завершения реакционную смесь разбавляли ДХМ, промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и солевым раствором, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очистка с помощью хроматографии на силикагеле (0-33% EtOAc/гексаны) давала желаемый продукт (4,5 г, 13 ммоль, выход 59%) в виде прозрачного масла. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,06 (t, *J*=6,6 Гц, 2H), 3,40 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 2,29 (t, *J*=7,4 Гц, 2H), 1,185 (m, 2H), 1,61 (m, 4H), 1,43 (m, 2H), 1,31 (m, 18H), 0,88 (t, *J*=6,8 Гц, 3H) м.д.

Промежуточное соединение 1b: нонил 8-(2-гидроксиэтиламино)октаноат



Раствор промежуточного соединения 1a (12 г, 34,35 ммоль) и 2-аминоэтанола (20-40 экв.) в этаноле (EtOH) (10 мл) перемешивали в течение по меньшей мере 12 ч при 20 °C. Затем реакционную смесь концентрировали для удаления EtOH, выливали в воду и экстрагировали EtOAc (3 раза). Объединенные органические слои дважды промывали солевым раствором, сушили безводным сульфатом натрия (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (20-100% EtOAc в петролейном эфире, затем MeOH) с получением желаемого продукта (4 г, 12 ммоль, выход 35%) в виде желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 3,99 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,57 (t, *J*=5,2 Гц, 2H), 2,69 (t, *J*=5,2 Гц, 2H), 2,54 (t, *J*=7,2 Гц, 2H), 2,22 (t, *J*=7,4 Гц, 2H), 1,56-1,20 (m, 24H), 0,81 (t, *J*=6,8 Гц, 3H) м.д.

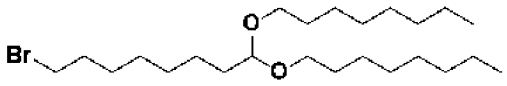
Промежуточное соединение 1c: 8-бромоктаналь



К раствору 8-бромоктан-1-ола (45,1 мл, 263 ммоль) в ДХМ (700 мл) добавляли хлорхромат пиридиния (ПХХ) (1-2 экв.). После перемешивания при температуре 15°C в течение по меньшей мере 2 ч реакционную смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (2-20% EtOAc в петролейном эфире) с получением желаемого продукта (37,5 г, 163,0 ммоль, выход 62%) в виде бесцветного масла. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,77 (t, *J*=1,8 Гц, 1H),

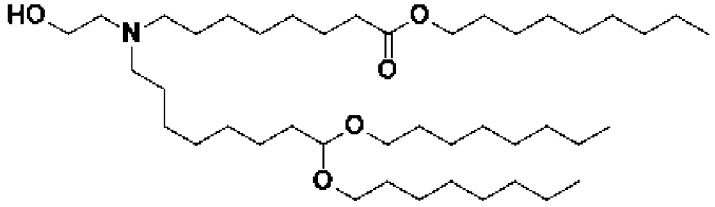
3,40 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 2,43 (m, 2H), 1,86 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,45 (m, 2H) 1,34 (m, 4H) м.д.

Промежуточное соединение 1d: 8-бром-1,1-диоктокси-октан



К раствору 8-бромоктаналя (12,5 г, 60,3 ммоль) и октан-1-ола (2-3 экв.) в ДХМ (300 мл) добавляли моногидрат *п*-толуолсульфоновой кислоты (0,1-0,2 экв.) и Na_2SO_4 (2-3 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 15 °C в течение по меньшей мере 24 ч, затем фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (100% петролейный эфир) с получением желаемого продукта (6 г, 13,4 ммоль, выход 22%) в виде бесцветного масла. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,6 Гц, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 1,84 (m, 2H), 1,59 (m, 6H), 1,33-1,28 (m, 34H), 0,89 (t, *J*=6,6 Гц, 6H) м.д.

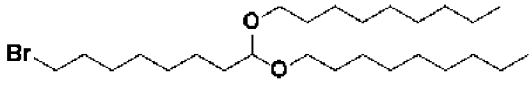
Соединение 1: нонил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Смесь промежуточного соединения 1d (1 г, 2,22 ммоль), промежуточного соединения 1b (0,9-1,1 экв.), K_2CO_3 (2-4 экв.) и KI (0,1-0,5 экв.) в 3:1 MeCN/CPME (0,1-0,5 М) дегазировали и трижды продували N_2. Реакционную смесь нагревали до 82°C и перемешивали в течение по меньшей мере 2 ч в инертной атмосфере. После этого реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали по меньше мере 2x EtOAc. Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (10-33% EtOAc в петролейном эфире) с получением желаемого продукта (700 мг, 1,00 ммоль, выход 45%) в виде бесцветного масла. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,50 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,54 (m, 4H), 3,40 (m, 2H), 2,56 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,42 (t, *J*=7,4 Гц, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,58 (m, 10H), 1,45-1,21 (m, 50H) 0,88 (t, *J*=6,8 Гц, 9H) м.д. МС: 699,29 м/з [M+H].

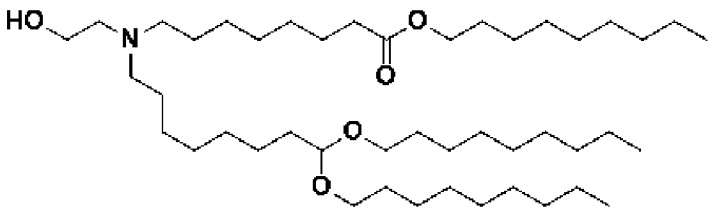
Пример 2 - Соединение 2

Промежуточное соединение 2a: 1-(8-бром-1-нонокси-октокси)нонан



Промежуточное соединение 2a синтезировали с выходом 24% из промежуточного соединения 1c и нонан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 1,86 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,33 (m, 32H), 0,89 (6, *J*=6,8 Гц, 6H) м.д.

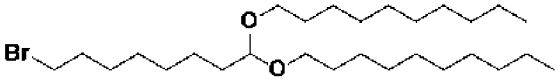
Соединение 2: 8-[8,8-ди(нонокси)октил-(2-гидроксиэтил)амино]октаноат



Соединение 2 синтезировали с выходом 54% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 2a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,50 (t, *J*=5,6 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,54 (m, 4H), 3,40 (m, 2H), 2,56 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,42 (t, *J*=7,4 Гц, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,58 (m, 10H), 1,46-1,21 (m, 54H), 0,88 (t, *J*=6,6 Гц, 9H) м.д. МС: 727,01 м/з [M+H].

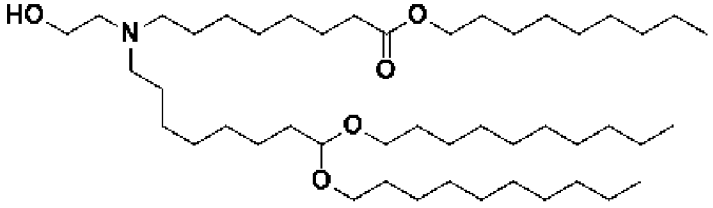
Пример 3 - Соединение 3

Промежуточное соединение 3a: 1-(8-бром-1-декокси-октокси)декан



Промежуточное соединение 3a синтезировали с выходом 24% из промежуточного соединения 1c и декан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 4H), 1,86 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,33 (m, 36H), 0,89 (t, *J*=6,8 Гц, 6H) м.д.

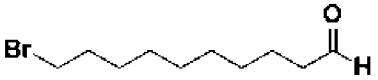
Соединение 3: нонил 8-[8,8-дидекоксиоктил(2-гидроксиэтил)амино]октаноат



Соединение 3 синтезировали с выходом 28% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 3a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,50 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,53 (m, 4H), 3,39 (m, 2H), 2,56 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,43 (t, *J*=7,4 Гц, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,58 (m, 10H), 1,46-1,20 (m, 58H), 0,88 (t, *J*=6,6 Гц, 9H) м.д. МС 755,04 м/з [M+H].

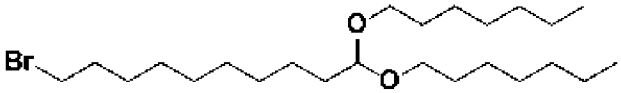
Пример 4 - Соединение 4

Промежуточное соединение 4a: 10-бромоктаналь



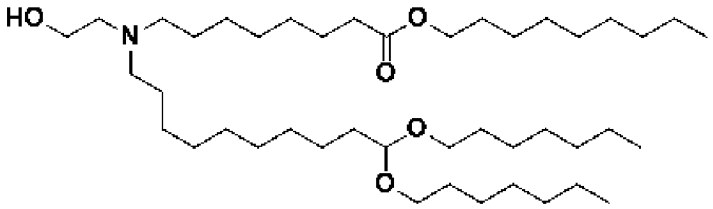
Промежуточное соединение 4a синтезировали с выходом 55% из 10-бромоктанола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1c. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,77 (s, 1H), 3,41 (t, *J*=7,0 Гц, 2H), 2,42 (t, *J*=7,4 Гц, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,42 (m, 2H), 1,30 (m, 8H) м.д.

Промежуточное соединение 4b: 10-бром-1,1-дигептоксидекан



Промежуточное соединение 4b синтезировали с выходом 32% из промежуточного соединения 4a и гептан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 1,86 (m, 2H), 1,58 (m, 6H), 1,33 (m, 28H), 0,89 (t, *J*=7,0 Гц, 6H) м.д.

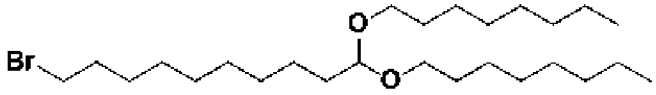
Соединение 4: нонил 8-[10, 10-дигептоксидецил(2-гидроксиэтил)амино]октаноат



Соединение 4 синтезировали с выходом 19% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 4b с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,6 Гц, 2H), 3,55 (m, 4H), 3,40 (m, 4H), 2,59 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,45 (m, 4H), 2,29 (t, *J*=7,4 Гц, 2H), 1,59 (m, 10H), 1,44-1,22 (m, 50H), 0,88 (t, *J*=7,0 Гц, 9H) м.д. МС 699,53 м/з [M+H].

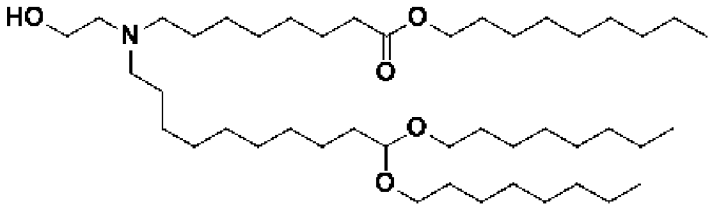
Пример 5 - Соединение 5

Промежуточное соединение 5a: 10-бром-1,1-дигептоксидекан



Промежуточное соединение 5a синтезировали с выходом 34% из промежуточного соединения 4a и октан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,45 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 3,55 (m, 2H), 3,40 (m, 4H), 1,85 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,33 (m, 32 H), 0,88 (t, *J*=6,8 Гц, 6H) м.д.

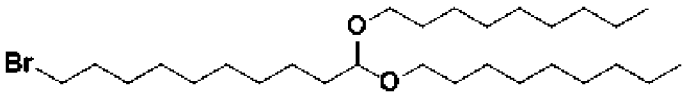
Соединение 5: 8-[10,10-диоктоксидецил(2-гидроксиэтил)амино]октаноат



Соединение 5 синтезировали с выходом 27% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 5a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,06 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,56 (m, 4H), 3,40 (m, 2H), 2,58 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,45 (m, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,59 (m, 10H), 1,47-1,25 (m, 54H), 0,89 (t, *J*=6,6 Гц, 9H) м.д. СВЭЖХ-МС-ИДС: в.у. = 6,58 мин, 727,54 м/з [M+H].

Пример 6 - Соединение 6

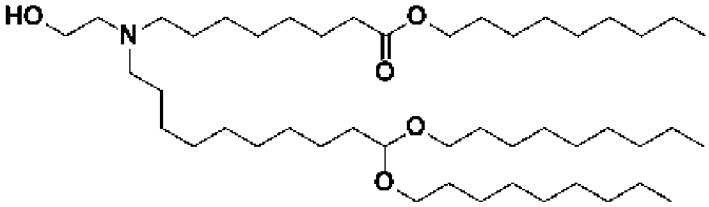
Промежуточное соединение 6a: 10-бром-1,1-бис(нонилокси)декан



Промежуточное соединение 6a синтезировали с выходом 41% из промежуточного

соединения 4a и нонан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 1,86 (m, 2H), 1,58 (m, 6H), 1,42-1,28 (m, 36H), 0,89 (t, *J*=6,8 Гц, 6H) м.д.

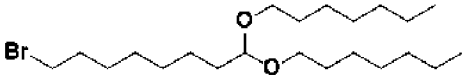
Соединение 6: 8-[10,10-ди(нонокси)децил-(2-гидроксиэтил)амино]октаноат



Соединение 6 синтезировали с выходом 41% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 6a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,45 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,54 (m, 4H), 3,39 (m, 2H), 2,57 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,44 (t, *J*=7,6 Гц, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,58 (m, 10H), 1,46-1,24 (m, 58H), 0,88 (t, *J*=6,6 Гц, 9H) м.д. МС: 755,71 м/з [M+H].

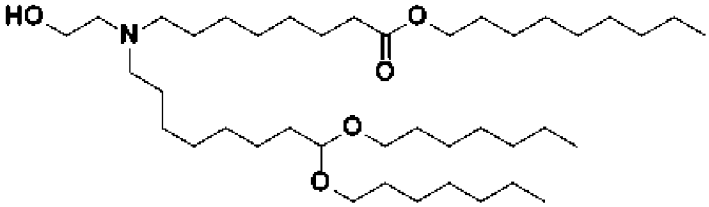
Пример 7 - Соединение 7

Промежуточное соединение 7a: 8-бром-1,1-бис(гептилокси)октан



Промежуточное соединение 7a синтезировали с выходом 39% из промежуточного соединения 1c и гептан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 1,86 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,32 (m, 24H), 0,89 (t, *J*=7,0 Гц, 6H) м.д.

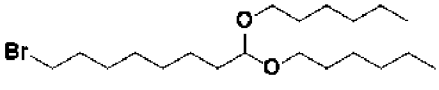
Соединение 7: нонил 8-((8,8-бис(гептилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 7 синтезировали с выходом 22% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 7a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 4,45 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,60-3,48 (m, 4H), 3,40 (m, 2H), 2,56 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,43 (dd, *J*=8,5, 6,3 Гц, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,67-1,52 (m, 10H), 1,48-1,19 (m, 46H), 0,88 (m, 9H) м.д. МС: 671,66 м/з [M+H].

Пример 8 - Соединение 8

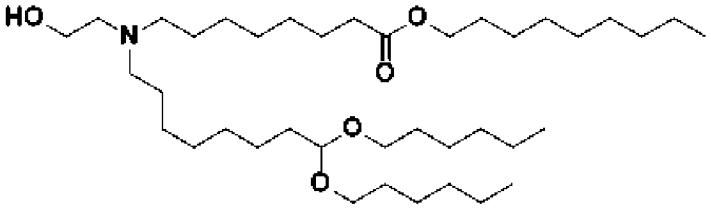
Промежуточное соединение 8a: 8-бром-1,1-бис(гексилокси)октан



Промежуточное соединение 8a синтезировали с выходом 38% из промежуточного

соединения 1c и гексан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,6 Гц, 1H), 3,57 (m, 2H), 3,40 (m, 4H), 1,85 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,35 (m, 20H), 0,89 (t, *J*=6,8 Гц, 6H) м.д.

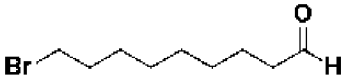
Соединение 8: нонил 8-((8,8-бис(гексилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 8 синтезировали с выходом 13% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 8a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,45 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,60-3,49 (m, 4H), 3,40 (m, 2H), 2,57 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,43 (t, *J*=7,6 Гц, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,58 (m, 10H), 1,47-1,19 (m, 42H), 0,88 (m, 9H) м.д. МС: 643,58 м/з [M+H].

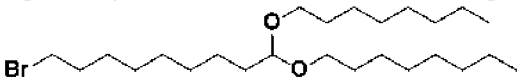
Пример 9 - Соединение 9

Промежуточное соединение 9a: 9-бромнонаналь



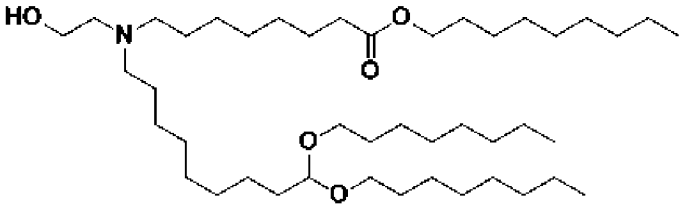
Промежуточное соединение 9a синтезировали с выходом 40% из 9-бромоктанола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1c. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,70 (t, *J*=1,8 Гц, 1H), 3,34 (t, *J*=6,8 Гц 2H), 2,36 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 1,57 (m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,26 (m, 6H) м.д.

Промежуточное соединение 9b: 9-бром-1,1-бис(октилокси)нонан



Промежуточное соединение 9b синтезировали с выходом 44% из промежуточного соединения 9a и октан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,6 Гц, 1H), 3,57 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 1,86 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,31 (m, 30H), 0,89 (t, *J*=6,8 Гц, 6H) м.д.

Соединение 9: нонил 8-((9,9-бис(октилокси)нонил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат

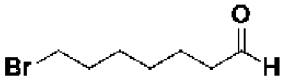


Соединение 9 синтезировали с выходом 17% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 9b с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,45 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,62-3,49 (m, 4H), 3,40 (m, 2H), 2,57 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,44 (t, *J*=7,6 Гц, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,58 (m,

10H), 1,48-1,19 (m, 52H), 0,88 (t, *J*=6,6 Гц, 9H) м.д. МС: 713,52 м/з [M+H].

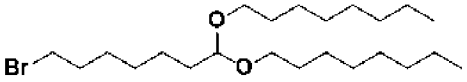
Пример 10 - Соединение 10

Промежуточное соединение 10a: 7-бромгептаналь



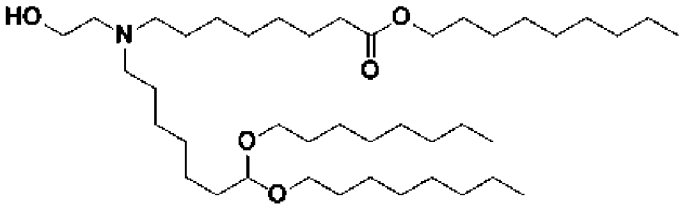
Промежуточное соединение 10a синтезировали с выходом 35% из 7-бромгептанола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1c. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,77 (s, 1H), 3,41 (t, *J*=6,6 Гц, 2H), 2,44 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,37 (m, 2H) м.д.

Промежуточное соединение 10b: 1-((7-бром-1-(октилокси)гептил)окси)октан



Промежуточное соединение 10b синтезировали с выходом 42% из промежуточного соединения 10a и октан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,6 Гц, 1H), 3,57 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 1,85 (m, 2H), 1,58 (m, 6H), 1,33 (m, 26H), 0,89 (t, *J*=6,8 Гц, 6H) м.д.

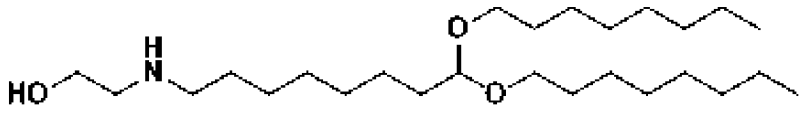
Соединение 10: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 10 синтезировали с выходом 19% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 10b с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 4,46 (t, *J*=5,8 Гц, 1H), 4,05 (t, *J*=6,8 Гц, 2H), 3,59-3,49 (m, 4H), 3,39 (m, 2H), 2,56 (t, *J*=5,4 Гц, 2H), 2,43 (t, *J*=7,4 Гц, 4H), 2,29 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 1,58 (m, 10H), 1,47-1,21 (m, 48H), 0,88 (t, *J*=6,6 Гц, 9H) м.д. МС: 685,75 м/з [M+H].

Пример 11 - Соединение 11

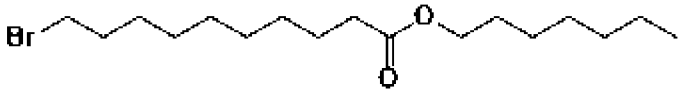
Промежуточное соединение 11a: 2-((8,8-бис(октилокси)октил)амино)этан-1-ол



К раствору промежуточного соединения 1d (24 г, 115,88 ммоль) и октан-1-ола (2-4 экв.) в ДХМ (240 мл) добавляли $TsOH \cdot H_2O$ (0,1-0,3 экв.) и Na_2SO_4 (2-3 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение по меньшей мере 12 часов. После завершения реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления ДХМ. Остаток разбавляли водой и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали

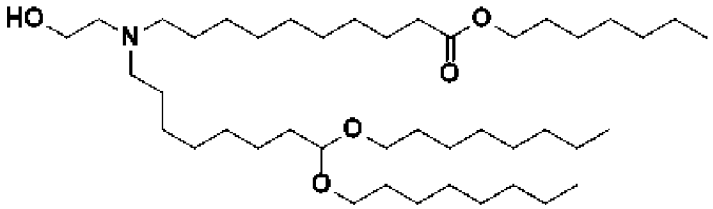
колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (25 г, 48%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,38 (t, J=5,8 Гц, 1H), 3,61-3,54 (m, 2H), 3,49 (dt, J=9,3, 6,6 Гц, 2H), 3,33 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,75-2,66 (m, 2H), 2,55 (t, J=7,2 Гц, 2H), 1,97 (d, J=12,5 Гц, 3H), 1,58-1,35 (m, 8H), 1,34-1,01 (m, 27H), 0,93-0,72 (m, 6H) м.д. МС: 430,4 м/з [M+H].

Промежуточное соединение 11b: гептил 10-бромдеканоат



Промежуточное соединение 11b было синтезировано с выходом 32% из 10-бромдекановой кислоты и гептан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 3,99 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,33 (t, J=6,9 Гц, 2H), 2,22 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,83-1,68 (m, 2H), 1,55 (d, J=14,3 Гц, 4H), 1,35 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,22 (m, 16H), 0,86-0,78 (m, 3H) м.д.

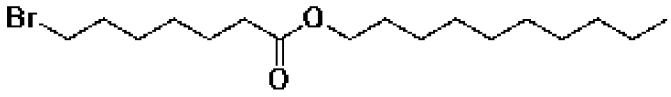
Соединение 11: гептил 10-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)деканоат



Соединение 11 синтезировали с выходом 19% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 11b с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,67-3,60 (m, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,70 (s, 2H), 2,58 (s, 4H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,67-1,44 (m, 15H), 1,29 (m, 46H), 0,94-0,81 (m, 9H) м.д. МС: 699,35 м/з [M+H].

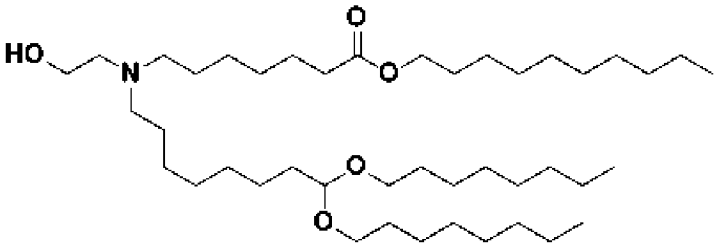
Пример 12 - Соединение 12

Промежуточное соединение 12a: децил 7-бромгептаноат



Промежуточное соединение 12a синтезировали с выходом 26% из 7-бромгептановой кислоты и декан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,09 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,44 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,34 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,96-1,83 (m, 2H), 1,70-1,57 (m, 4H), 1,49 (m, 2H), 1,44-1,22 (m, 16H), 0,97-0,85 (m, 3H) м.д.

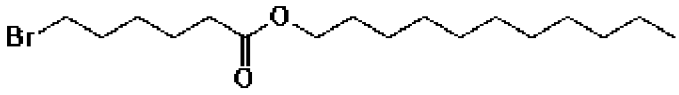
Соединение 12: децил 7-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)гептаноат



Соединение 12 синтезировали с выходом 56% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 12a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,60-3,51 (m, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,61 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,55-2,41 (m, 4H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,69-1,51 (m, 10H), 1,51-1,20 (m, 49H), 0,94-0,83 (m, 9H) м.д. МС: 699,52 м/з [M+H].

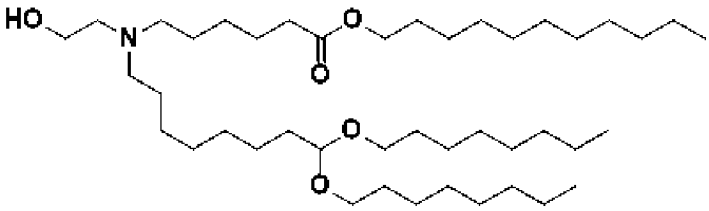
Пример 13 - Соединение 13

Промежуточное соединение 13a: ундецил 6-бромгексаноат



Промежуточное соединение 13a синтезировали с выходом 22% из 6-бромгексановой кислоты и ундекан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,06 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,40 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,31 (t, J=7,4 Гц, 2H), 1,87 (dt, J=14,2, 6,9 Гц, 2H), 1,70-1,57 (m, 4H), 1,53-1,42 (m, 2H), 1,38-1,19 (m, 16H), 0,87 (t, J=6,7 Гц, 3H) м.д.

Соединение 13: ундецил 6-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)гексаноат



Соединение 13 синтезировали с выходом 64% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 13a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,60-3,52 (m, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,62 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,50 (q, J=6,7 Гц, 4H), 2,30 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,70-1,40 (m, 15H), 1,40-1,17 (m, 45H), 0,93-0,83 (m, 9H) м.д. МС: 699,31 м/з [M+H].

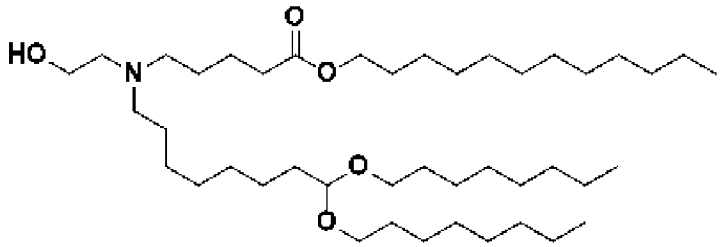
Пример 14 - Соединение 14

Промежуточное соединение 14a: додецил 5-бромпентаноат

Промежуточное соединение 14a синтезировали с выходом 21% из 5-бромпентановой кислоты и додекан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединении 1a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,00 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,35 (t,

J=6,6 Гц, 2H), 2,27 (t, J=7,3 Гц, 2H), 1,83 (m, 2H), 1,71 (m, 2H), 1,55 (t, J=7,1 Гц, 2H), 1,31-1,13 (m, 18H), 0,85-0,78 (m, 3H) м.д.

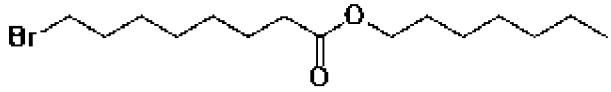
Соединение 14: додецил 5-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)пентаноат



Соединение 14 синтезировали с выходом 62% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 14a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,06 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,63-3,49 (m, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,62 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,58-2,44 (m, 4H), 2,32 (t, J=7,3 Гц, 2H), 1,68-1,40 (m, 15H), 1,40-1,19 (m, 47H), 0,94-0,83 (m, 9H) м.д. МС: 699,48 м/з [M+H].

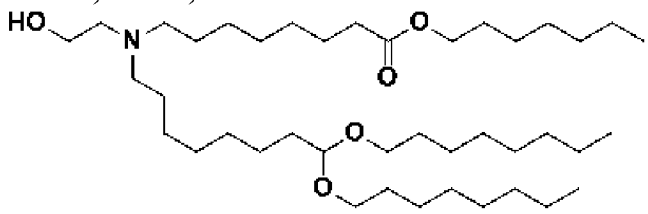
Пример 15 - Соединение 15

Промежуточное соединение 15a: гептил 8-бромоктаноат



Промежуточное соединение 15a синтезировали с выходом 15% из 8-бромоктановой кислоты и гептан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 3,99 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,33 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,23 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,78 (m, 2H), 1,63-1,50 (m, 4H), 1,42-1,13 (m, 14H), 0,87-0,77 (m, 3H) м.д.

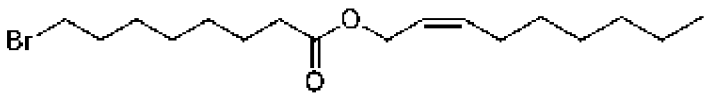
Соединение 15: гептил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 15 синтезировали с выходом 64% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 15a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,62-3,50 (m, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,64 (t, J=5,2 Гц, 2H), 2,51 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,66-1,40 (m, 15H), 1,40-1,19 (m, 43H), 0,88 (m, 9H) м.д. МС: 671,84 м/з [M+H].

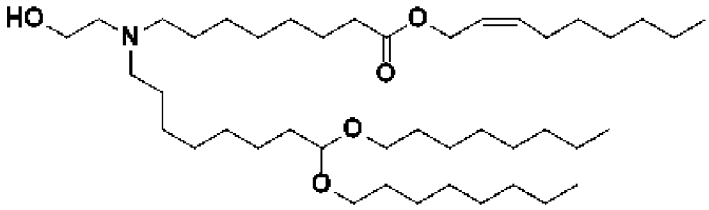
Пример 16 - Соединение 16

Промежуточное соединение 16a: (Z)-нон-2-ен-1-ил 8-бромоктаноат



Промежуточное соединение 16a синтезировали с выходом 26% из 8-бромоктановой кислоты и (Z)-нон-2-ен-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 5,70-5,58 (m, 1H), 5,58-5,47 (m, 1H), 4,62 (dd, J=6,9, 1,3 Гц, 2H), 3,40 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,30 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,09 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,67-1,58 (m, 2H), 1,52-1,09 (m, 13H), 0,94-0,80 (m, 3H) м.д.

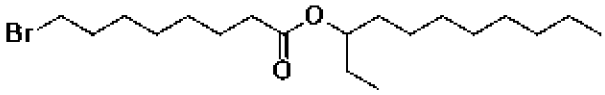
Соединение 16: (Z)-нон-2-ен-1-ил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 16 синтезировали с выходом 59% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 16a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 5,70-5,58 (m, 1H), 5,52 (m, 1H), 4,62 (dd, J=6,9, 1,3 Гц, 2H), 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,64-3,48 (m, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,64 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,51 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,30 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,09 (m, 2H), 1,68-1,41 (m, 12H), 1,41-1,18 (m, 41H), 0,96-0,81 (m, 9H) м.д. МС: 697,33 м/з [M+H]. МС: 697,33 м/з [M+H].

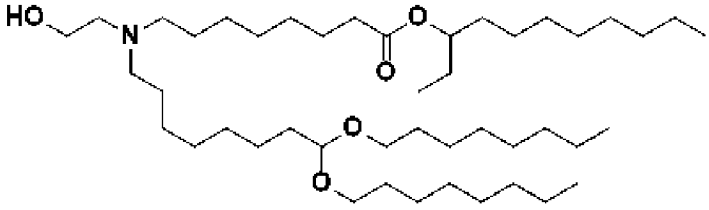
Пример 17 - Соединение 17

Промежуточное соединение 17a: ундекан-3-ил 8-бромоктаноат



Промежуточное соединение 17a синтезировали с выходом 50% из 8-бромоктановой кислоты и ундекан-3-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,74 (m, 1H), 3,33 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,22 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,85-1,67 (m, 2H), 1,62-1,09 (m, 25H), 0,89-0,74 (m, 6H) м.д.

Соединение 17: ундекан-3-ил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат

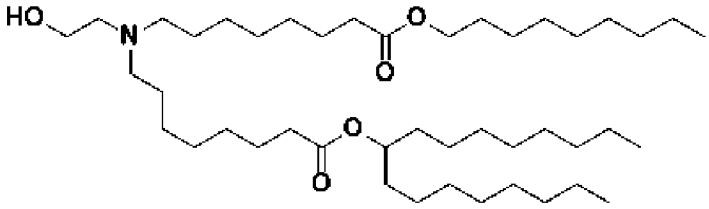


Соединение 17 синтезировали с выходом 65% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 17a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,80 (m, 1H), 4,45 (t, J=5,8 Гц, 1H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,4 Гц, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,62 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,49 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,28 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,66-1,40 (m, 16H), 1,40-1,17 (m, 45H), 0,87 (m, 12H) м.д. МС: 727,34

м/з [M+H].

Пример 18 - Соединение 18

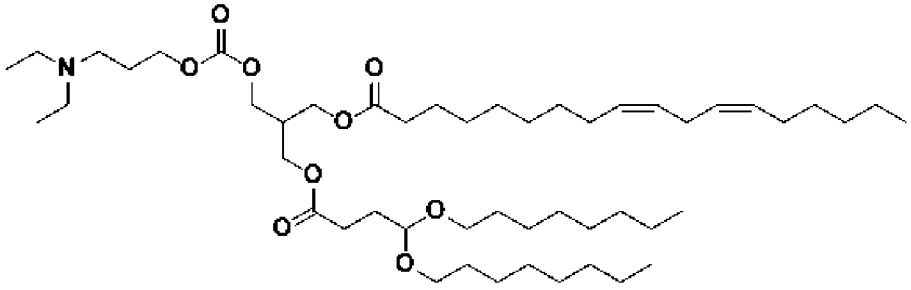
Соединение 18: гептадекан-9-ил 8-((2-гидроксиэтил)(8-(нонилокси)-8-оксооктил)амино)октаноат



Соединение 18 синтезировали согласно способам, описанным в Mol. Ther. **2018**, 26, 1509-1519 (соединение 5) и US 2017/0210698 A1 (соединение 18). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,86 (m, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,59 (br t, J=5,1 Гц, 2H), 2,75-2,39 (br m, 6H), 2,28 (m, 4H), 1,61 (m, 6H), 1,49 (m, 8H), 1,38-1,20 (m, 49H), 0,87 (m, 9H) м.д; МС: 711 м/з [M+H].

Пример 19 - Соединение 19

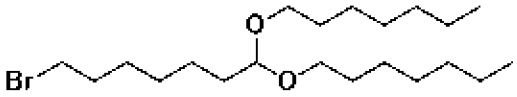
Соединение 19: 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2 -(((((3-(диэтиламино)пропокси))-карбонил)окси)метил)пропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат



Соединение 19 синтезировали в соответствии со способами, описанными в WO 2015/095340 Al (Пример 13). ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 5,35 (m, 4H), 4,48 (t, *J*=5,6 Гц, 1H), 4,17 (m, 8H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,77 (t, *J*=6,6 Гц, 2H), 2,55 (q, *J*=7,2 Гц, 6H), 2,40 (m, 3H), 2,30 (t, *J*=7,6 Гц, 2H), 2,05 (q, *J*=6,8 Гц, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,84 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,30 (m, 34H), 1,03 (t, *J*=7,2 Гц, 6H), 0,88 (m, 9H) м.д; МС: 853 m/z [M+H].

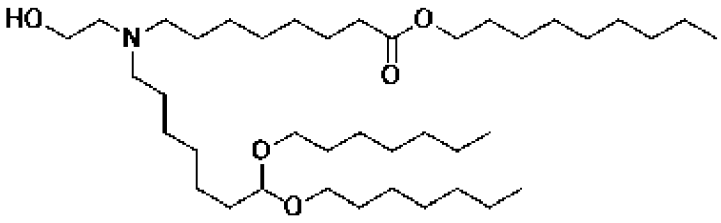
Пример 20 - Соединение 20

Промежуточное соединение 20a: 7-бром-1,1-бис(гептилокси)гептан



Промежуточное соединение 20a синтезировали с выходом 24% из промежуточного соединения 10a и гептан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 1d. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 9,77 (t, J=1,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 1H), 3,40 (t, J=6,8 Гц, 4H), 2,44 (td, J=7,3, 1,7 Гц, 2H), 2,33 (dt, J=25,0, 7,4 Гц, 1H), 1,93-1,79 (m, 4H), 1,71-1,53 (m, 5H), 1,51-1,29 (m, 9H).

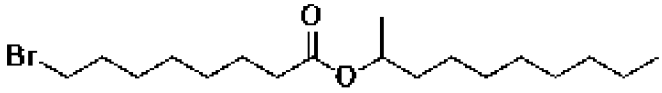
Соединение 20: нонил 8-((7,7-бис(гептилокси)гептил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 20 синтезировали с выходом 60% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 20a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 5,9 Гц, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,62 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,49 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,67-1,41 (m, 15H), 1,41-1,19 (m, 40H), 0,96-0,81 (m, 9H). МС: 657,2 м/з [M+H].

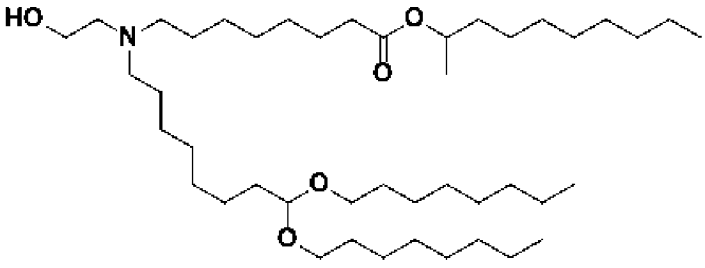
Пример 21 - Соединение 21

Промежуточное соединение 21a: декан-2-ил 8-бромоктаноат



К раствору, содержащему 8-бромоктановую кислоту (2,0 г, 1,0 экв.) в ДХМ (0,4 М), добавляли декан-2-ол (1,0 экв.), DMAP (0,2 экв.), Et_3N (3,5 экв) и EDCI (1,2 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 168 ч. После завершения реакцию гасили добавлением воды и ДХМ. Органический слой промывали 1x 1 М HCl и 1x 5% $NaHCO_3$. Органический слой сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Очистка на колонке (EtOAc/гекс) позволила получить продукт в виде бесцветного масла (485 мг, 12%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,97-4,82 (m, 1H), 3,53 (t, J=6,7 Гц, 2H), 2,27 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,76 (dq, J=7,8, 6,8 Гц, 2H), 1,66-1,58 (m, 2H), 1,51-1,40 (m, 3H), 1,37-1,23 (m, 15H), 1,19 (d, J=6,3 Гц, 3H), 0,93-0,84 (m, 3H).

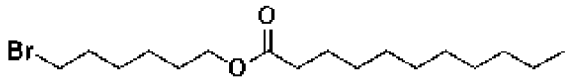
Соединение 21: декан-2-ил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 21 синтезировали с выходом 29% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 21a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,89 (ddt, J=12,1, 7,4, 6,3 Гц, 1H), 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,62-3,50 (m, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,64 (t, J=5,2 Гц, 2H), 2,51 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,26 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,66-1,40 (m, 15H), 1,29 (dd, J=16,9, 6,2 Гц, 44H), 1,19 (d, J=6,2 Гц, 3H), 0,95-0,82 (m, 9H). МС: 713,5 м/з [M+H].

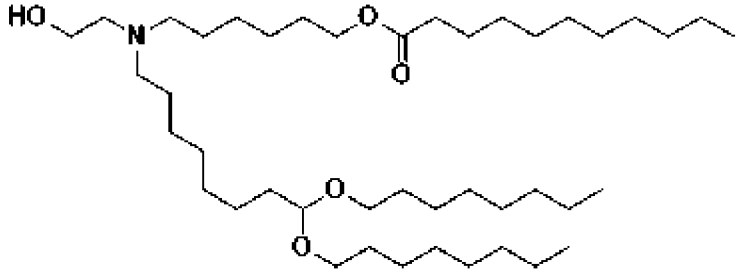
Пример 22 - Соединение 22

Промежуточное соединение 22a: 6-бромгексил ундеканоат



Смесь ундекановой кислоты (5 г, 1,0 экв.), 6-бромгексан-1-ола (1,0 экв.), EDCI (1,0 экв.), DMAP (0,16 экв.) и DIPEA (3,0 экв.) в ДХМ (0,2 М) дегазировали и продували N_2 3 раза, а затем смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в инертной атмосфере. После завершения реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления ДХМ. Остаток разбавляли H_2O и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Очистка на колонке (EtOAc/гекс) позволила получить продукт в виде бесцветного масла (2,3 г, 25%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,00 (t, J=6,6 Гц, 2H), 3,34 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,22 (t, J=7,6 Гц, 2H), 1,84-1,74 (m, 2H), 1,63-1,50 (m, 4H), 1,45-1,36 (m, 2H), 1,36-1,28 (m, 2H), 1,20 (d, J=9,9 Гц, 15H), 0,86-0,78 (m, 3H).

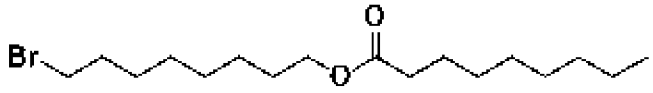
Соединение 22: 6-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)гексил ундеканоат



Соединение 22 синтезировали с выходом 63% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 22a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,64 (t, J=5,2 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,71 (t, J=5,2 Гц, 2H), 2,60 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,29 (t, J=7,6 Гц, 2H), 1,69-1,05 (m, 62H), 0,95-0,79 (m, 9H). МС: 699,4 м/з [M+H].

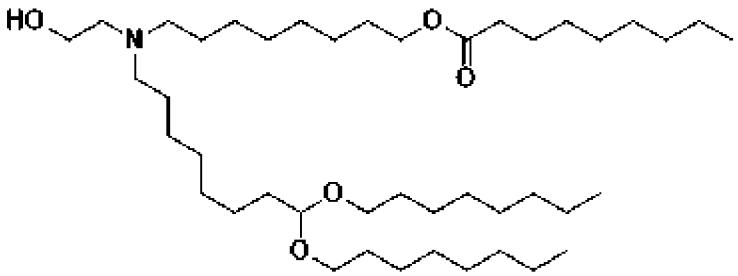
Пример 23 - Соединение 23

Промежуточное соединение 23a: 8-бромоктил нонаноат



Промежуточное соединение 23a синтезировали с выходом 19% из нонановой кислоты и 8-бромоктан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 22a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 3,99 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,34 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,22 (t, J=7,6 Гц, 2H), 1,78 (p, J=6,9 Гц, 2H), 1,55 (t, J=7,0 Гц, 4H), 1,42-1,10 (m, 19H), 0,87-0,74 (m, 3H).

Соединение 23: 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октил нонаноат



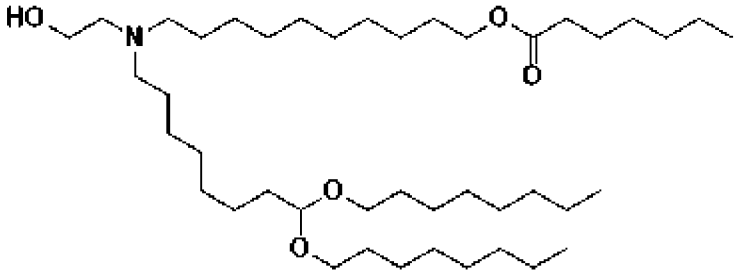
Соединение 23 синтезировали с выходом 32% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 23a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,63 (t, J=5,3 Гц, 2H), 3,56 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,70 (t, J=5,2 Гц, 2H), 2,58 (t, J=7,7 Гц, 4H), 2,29 (t, J=7,6 Гц, 2H), 1,68-1,17 (m, 65H), 0,88 (t, J=6,7 Гц, 9H). МС: 699,4 м/з [M+H].

Пример 24 - Соединение 24

Промежуточное соединение 24a: 10-бромдецил гептаноат

Промежуточное соединение 24a синтезировали с выходом 26% из гептановой кислоты и 10-бромдекан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 22a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,40 (t, J=6,9 Гц, 2H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,85 (dt, J=14,5, 6,9 Гц, 2H), 1,61 (p, J=7,7, 7,2 Гц, 4H), 1,48-1,23 (m, 18H), 0,93-0,84 (m, 3H).

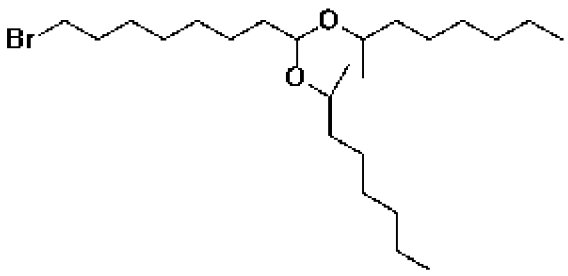
Соединение 24: 10-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)децил гептаноат



Соединение 24 синтезировали с выходом 40% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 24a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,66-3,50 (m, 4H), 3,40 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 2,69 (t, J=5,2 Гц, 2H), 2,57 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,69-0,98 (m, 63H), 0,97-0,70 (m, 9H). МС: 699,6 м/з [M+H].

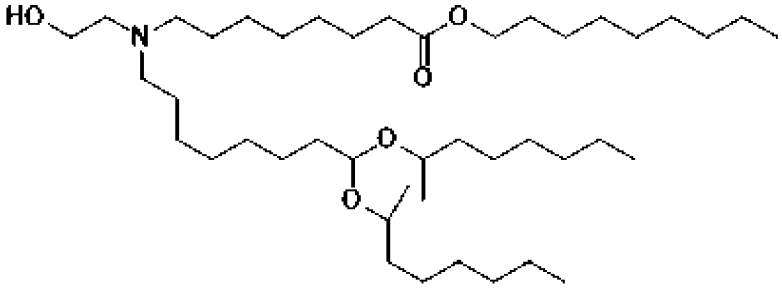
Пример 25 - Соединение 25

Промежуточное соединение 25a: 8-бром-1,1-бис(1-метилгептокси)октан



К раствору 8-бромоктаналя (100 мг, 1,0 экв.) в октан-2-оле (15 экв.) добавляли серную кислоту (0,1 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 часов. После завершения реакционную смесь гасили ледяной водой и дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и очищали на колонке (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (20 мг, 9%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,44 (td, J=5,6, 3,9 Гц, 1H), 3,64-3,49 (m, 2H), 3,33 (t, J=6,9 Гц, 2H), 1,78 (p, J=7,0 Гц, 2H), 1,60-1,41 (m, 4H), 1,41-1,14 (m, 24H), 1,10 (dd, J=6,2, 2,2 Гц, 3H), 1,03 (d, J=6,1 Гц, 3H), 0,81 (td, J=6,8, 2,5 Гц, 6H).

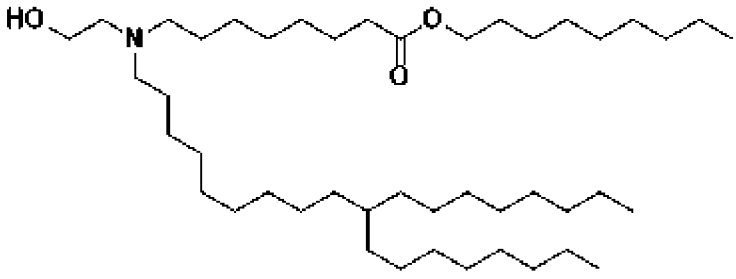
Соединение 25: нонил 8-[8,8-бис(1-метилгептокси)октил-(2-гидроксиэтил)амино]октаноат



Соединение 25 синтезировали из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 25a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,46-4,40 (m, 1H), 3,99 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,57 (tq, J=11,4, 5,9 Гц, 2H), 3,47 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,52 (t, J=5,3 Гц, 2H), 2,39 (t, J=7,5 Гц, 4H), 2,22 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,61-1,42 (m, 7H), 1,41-1,15 (m, 39H), 1,10 (dd, J=6,2, 2,1 Гц, 3H), 1,03 (d, J=6,1 Гц, 3H), 0,81 (t, J=6,5 Гц, 9H). МС: 699,7 м/з [M+H].

Пример 26 - Соединение 26

Соединение 26: нонил 8-((2-гидроксиэтил)(10-октилоктадецил)амино)октаноат

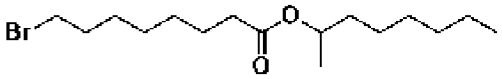


Соединение 26 синтезировали в соответствии со способами, описанными в WO 2017/049245 A3 (пример 153) ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 3,99 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,46 (t, J=5,4 Гц, 2H), 2,51 (t, J=5,4 Гц, 2H), 2,38 (t, J=7,5 Гц, 4H), 2,22 (t, J=7,5 Гц, 3H), 1,54 (t,

J=7,1 Гц, 5H), 1,37 (t, J=7,2 Гц, 4H), 1,33-1,07 (m, 63H), 0,81 (t, J=6,6 Гц, 9H). МС: 694,6 м/з [M+H].

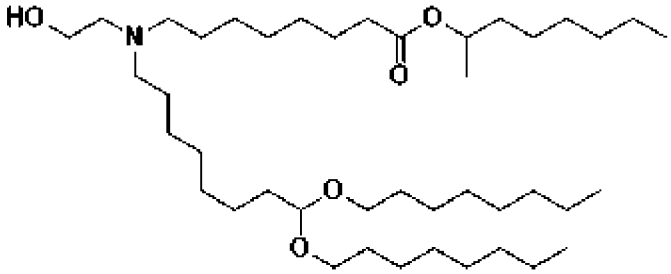
Пример 27 - Соединение 27

Промежуточное соединение 27a: октан-2-ил 8-бромоктаноат



К смеси 8-бромоктановой кислоты (10 г, 1,1 экв.) и октан-2-ола (1,0 экв.) в ДХМ (150 мл) добавляли EDCI (1,1 экв.), DMAP (0,1 экв.) и DIPEA (3,0 экв.) одной порцией при 0°C в инертной атмосфере. Смесь перемешивали при 15°C в течение по меньшей мере 12 часов. После завершения реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и полученный неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (4,1 г, 30%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,90-4,76 (m, 1H), 3,33 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,20 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,78 (p, J=7,0 Гц, 2H), 1,60-1,46 (m, 3H), 1,39 (dt, J=15,5, 6,6 Гц, 3H), 1,31-1,16 (m, 12H), 1,13 (d, J=6,3 Гц, 3H), 0,86-0,77 (m, 3H).

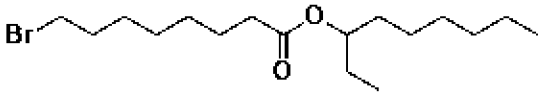
Соединение 27: октан-2-ил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 27 синтезировали с выходом 45% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 27a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,93-4,84 (m, 1H), 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,78 (s, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,6 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,77 (d, J=52,0 Гц, 5H), 2,27 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,93-1,40 (m, 17H), 1,39-1,21 (m, 37H), 1,19 (d, J=6,3 Гц, 3H), 0,99-0,67 (m, 9H). МС: 685,6 м/з [M+H].

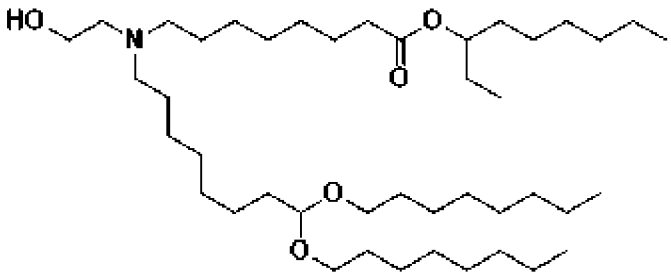
Пример 28 - Соединение 28

Промежуточное соединение 28a: нонан-3-ил 8-бромоктаноат



Промежуточное соединение 28a синтезировали с выходом 31% из 8-бромоктановой кислоты и нонан-3-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 27a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,75 (p, J=6,2 Гц, 1H), 3,33 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,22 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,78 (p, J=7,0 Гц, 2H), 1,55 (td, J=8,9, 8,2, 5,7 Гц, 2H), 1,47 (dtd, J=14,2, 7,1, 3,2 Гц, 4H), 1,36 (dt, J=10,1, 6,4 Гц, 2H), 1,32-1,12 (m, 12H), 0,88-0,76 (m, 6H).

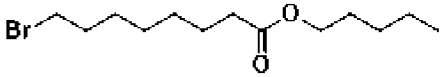
Соединение 28: нонан-3-ил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 28 синтезировали с выходом 53% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 28a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,81 (ddd, J=12,5, 6,9, 5,5 Гц, 1H), 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,80 (s, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 2,81 (s, 5H), 2,29 (t, J=7,4 Гц, 2H), 1,79-1,40 (m, 18H), 1,40-1,02 (m, 42H), 0,95-0,73 (m, 12H). МС: 699,3 м/з [M+H].

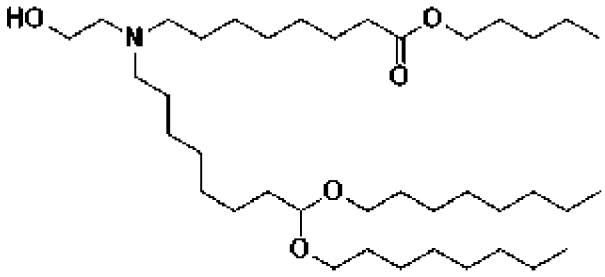
Пример 29 - Соединение 29

Промежуточное соединение 29a: пентил 8-бромоктаноат



Промежуточное соединение 29a синтезировали с выходом 47% из 8-бромоктановой кислоты и пентан-1-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 27a. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 3,99 (td, J=6,8, 1,6 Гц, 2H), 3,33 (td, J=6,8, 1,6 Гц, 2H), 2,23 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,84-1,75 (m, 2H), 1,56 (q, J=7,0 Гц, 4H), 1,47-1,33 (m, 2H), 1,26 (qt, J=5,0, 1,8 Гц, 8H), 0,86-0,80 (m, 3H).

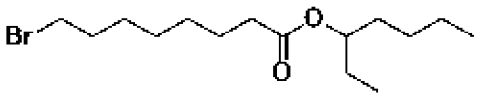
Соединение 29: пентил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 29 синтезировали с выходом 58% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 29a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц $CDCl_3$) δ 4,44 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,06 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,94 (s, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,03 (d, J=38,0 Гц, 5H), 2,29 (dd, J=8,5, 6,4 Гц, 2H), 1,79 (s, 4H), 1,67-1,41 (m, 14H), 1,41-1,12 (m, 37H), 1,02-0,76 (m, 9H). МС: 643,4 м/з [M+H].

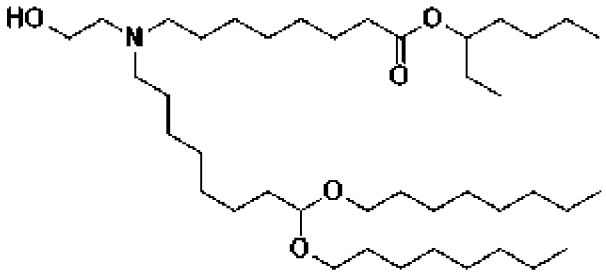
Пример 30 - Соединение 30

Промежуточное соединение 30a: гептан-3-ил 8-бромоктаноат



Промежуточное соединение 30a синтезировали с выходом 47% из 8-бромоктановой кислоты и гептан-3-ола с использованием способа, применяемого для промежуточного соединения 27a.

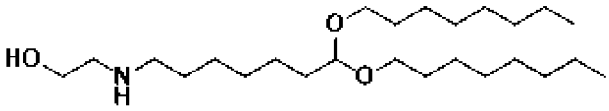
Соединение 30: гептан-3-ил 8-((8,8-бис(октилокси)октил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 30 синтезировали с выходом 66% из промежуточного соединения 11a и промежуточного соединения 30a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,81 (ddd, J=12,5, 6,8, 5,5 Гц, 1H), 4,45 (t, J=5,8 Гц, 1H), 3,77 (d, J=53,2 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,71 (s, 5H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,83-1,44 (m, 17H), 1,30 (dq, J=18,1, 3,8, 3,2 Гц, 37H), 1,02-0,69 (m, 12H). МС: 671,5 м/з [M+H].

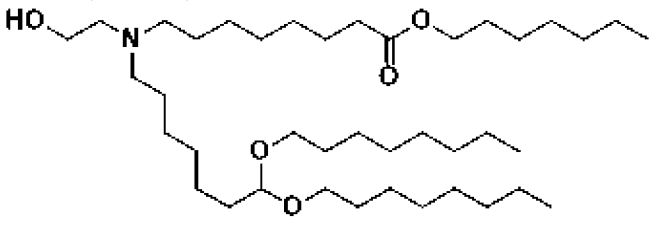
Пример 31 - Соединение 31

Промежуточное соединение 31a: 2-((7,7-бис(октилокси)гептил)амино)этан-1-ол



К раствору промежуточного соединения 10b (15 г, 1,0 экв.) в EtOH (22 мл) добавляли 2-аминоэтанол (30 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 12 часов. После завершения реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией. После концентрирования фракций, содержащих продукт, полученный остаток восстанавливали в MeCN и трижды экстрагировали гексаном. Объединенные слои гексана концентрировали с получением продукта в виде бесцветного масла (10,55 г, выход 73%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,47 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,68-3,62 (m, 2H), 3,58 (dt, J=9,3, 6,6 Гц, 2H), 3,42 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 2,82-2,76 (m, 2H), 2,63 (t, J=7,1 Гц, 2H), 1,67-1,45 (m, 8H), 1,45-1,19 (m, 26H), 0,96-0,84 (m, 6H).

Соединение 31: гептил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат

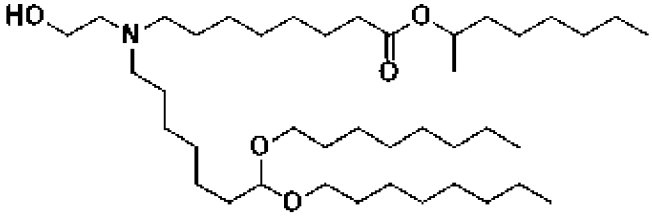


Соединение 31 синтезировали с выходом 68% из промежуточного соединения 31a

и промежуточного соединения 15a с использованием способа. применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,06 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,73 (s, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 2,58 (d, J=135,2 Гц, 6H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,59 (ddt, J=21,1, 14,3, 6,8 Гц, 15H), 1,44-1,02 (m, 40H), 0,88 (td, J=7,0, 2,9 Гц, 9H). МС: 657,4 м/з [M+H].

Пример 32 - Соединение 32

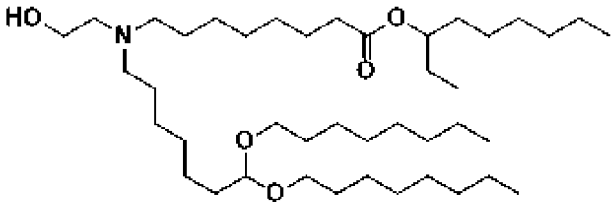
Соединение 32: октан-2-ил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 32 синтезировали с выходом 64% из промежуточного соединения 31a и промежуточного соединения 27a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 4,89 (h, J=6,3 Гц, 1H), 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,55 (dt, J=9,4, 6,8 Гц, 5H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,8 Гц, 2H), 3,07-2,32 (m, 7H), 2,27 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,79-1,40 (m, 15H), 1,40-1,22 (m, 38H), 1,19 (d, J=6,2 Гц, 3H), 0,88 (t, J=6,8 Гц, 9H). МС: 671,4 м/з [M+H].

Пример 33 - Соединение 33

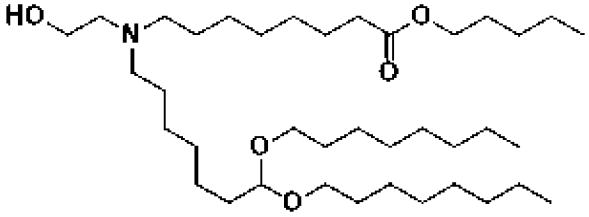
Соединение 33: нонан-3-ил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 33 синтезировали с выходом 60% из промежуточного соединения 31a и промежуточного соединения 28a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 4,81 (p, J=6,3 Гц, 1H), 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 4H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,89-2,40 (m, 5H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,57 (dtt, J=21,7, 14,5, 6,4 Гц, 14H), 1,41-1,08 (m, 35H), 0,88 (td, J=7,1, 2,8 Гц, 10H). МС: 685,7 м/з [M+H].

Пример 34 - Соединение 34

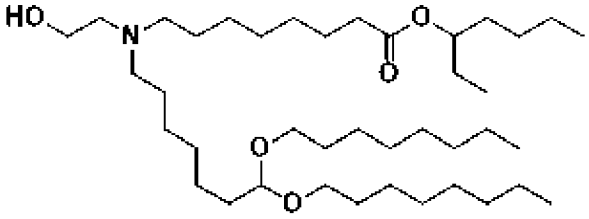
Соединение 34: пентил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 34 синтезировали с выходом 72% из промежуточного соединения 31a и промежуточного соединения 29a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,75 (s, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,39 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,94-2,40 (m, 6H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,83-1,43 (m, 15H), 1,42-1,09 (m, 36H), 0,89 (dt, J=11,2, 7,0 Гц, 9H). МС: 629,4 м/з [M+H].

Пример 35 - Соединение 35

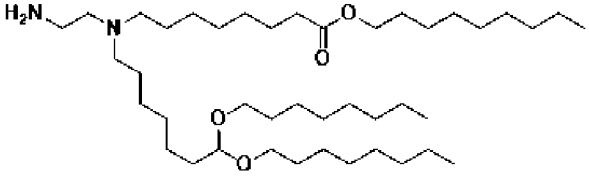
Соединение 35: гептан-3-ил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-гидроксиэтил)амино)октаноат



Соединение 35 синтезировали с выходом 73% из промежуточного соединения 31a и промежуточного соединения 30a с использованием способа, применяемого для соединения 11. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,85-4,78 (m, 1H), 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,68 (s, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,39 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,86-2,37 (m, 6H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,53 (dtd, J=14,4, 7,4, 5,6 Гц, 16H), 1,43-1,08 (m, 37H), 0,97-0,80 (m, 12H). МС: 657,6 м/з [M+H].

Пример 36 - Соединение 36

Соединение 36: нонил 8-((2-аминоэтил)(7,7-бис(октилокси)гептил)амино)октаноат



К смеси соединения 10 (5,1 г, 1,0 экв.) и ТЭА (1,35 мл, 1,3 экв.) в ДХМ (50 мл) по каплям добавляли MsCl (721 мкл, 1,25 экв.) при 0°C в инертной атмосфере. Смесь перемешивали при 15°C в течение 12 часов. ТСХ показала, что стартовый материал был полностью израсходован. Реакционную смесь разбавляли H_2O и дважды экстрагировали ДХМ, сушили над Na_2SO_4, фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка.

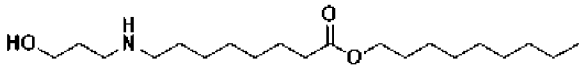
Полученный неочищенный мезилат растворяли в ДМФА (60 мл) с последующим добавлением NaN_3 (2,78 г, 5,0 экв.) одной порцией при 15°C в инертной атмосфере. Смесь перемешивали при 100°C в течение 4 часов. ТСХ показала полное вытеснение. Реакционную смесь разбавляли H_2O и дважды экстрагировали EtOAc, сушили над Na_2SO_4, фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка.

Полученный неочищенный азид растворяли в EtOH (5 мл) с последующим добавлением Pd/C (1 г, 10% мас/мас) в инертной атмосфере. Суспензию дегазировали под

вакуумом и несколько раз продували H_2 . Смесь перемешивали в атмосфере H_2 (15 фунт/кв. дюйм) при 15°C в течение 12 часов. После завершения реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток трижды очищали колоночной хроматографией, после чего выделенный материал промывали MeCN и гексанами с получением продукта в виде желтого масла (2,3 г, 39%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,80 (s, 3H), 4,38 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,98 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,48 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 3,33 (dt, J=9,5, 6,8 Гц, 2H), 2,82 (t, J=5,9 Гц, 2H), 2,57 (t, J=6,0 Гц 2H), 2,50-2,36 (m, 4H), 2,22 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,62-1,33 (m, 15H), 1,33-1,04 (m, 45H), 0,81 (t, J=6,6 Гц, 9H). МС: 683,6 м/з [M+H].

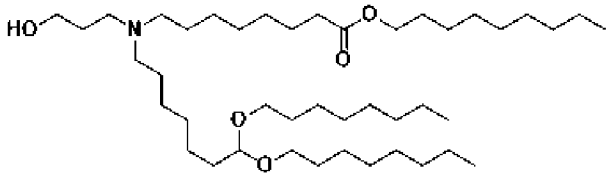
Пример 37 - Соединение 37

Промежуточное соединение 37a: нонил 8-((3-гидроксипропил)амино)октаноат



Смесь нонил-8-бромоктаноата (10 г, 1,0 экв.) и 3-аминопропан-1-ола (66,22 мл, 30 экв.) в EtOH (15 мл) перемешивали при 20°C в течение 12 часов. После завершения реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта (10 г) в виде бесцветного масла. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,07 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,84 (dt, J=10,5, 5,4 Гц, 2H), 3,66 (t, J=5,6 Гц, 6H), 3,43 (q, J=6,2 Гц, 6H), 2,89 (t, J=5,6 Гц, 2H), 2,61 (t, J=7,1 Гц, 2H), 2,30 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,03 (s, 10H), 1,66 (dt, J=29,5, 6,6 Гц, 14H), 1,47 (t, J=7,0 Гц, 3H), 1,31 (d, J=14,6 Гц, 16H), 0,90 (t, J=6,6 Гц, 3H).

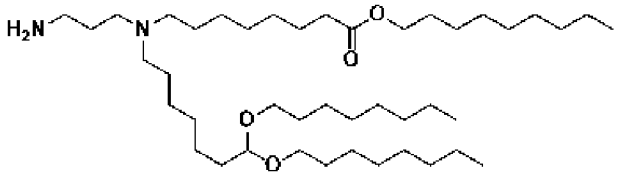
Соединение 37: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(3-гидроксипропил)амино)октаноат



Соединение 37 синтезировали с выходом 30% из промежуточного соединения 1b и промежуточного соединения 37a с использованием способа, применяемого для соединения 1. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,47 (t, J=5,7 Гц, 2H), 4,08 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,81 (t, J=5,1 Гц, 2H), 3,60-3,55 (m, 2H), 3,42 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 3H), 2,68-2,62 (m, 2H), 2,47-2,38 (m, 4H), 2,31 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,61 (dt, J=21,4, 7,2 Гц, 21H), 1,31 (dt, J=15,0, 4,1 Гц, 51H), 0,90 (t, J=6,7 Гц, 9H). МС: 698,7 м/з [M+H].

Пример 38 - Соединение 38

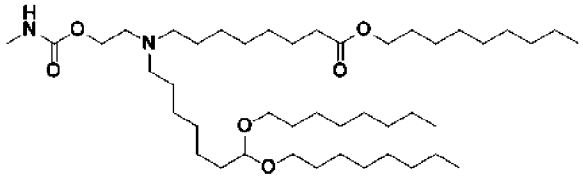
Соединение 38: нонил 8-((3-аминопропил)(7,7-бис(октилокси)гептил)амино)октаноат



Соединение 38 синтезировали из соединения 37 с использованием способа, применяемого для соединения 36. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,38 (t, J=5,7 Гц, 1H), 3,98 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,48 (dt, J=9,5, 6,7 Гц, 2H), 3,33 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 2,77 (q, J=5,2, 4,0 Гц, 2H), 2,48 (t, J=6,9 Гц, 2H), 2,43-2,31 (m, 4H), 2,22 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,54 (dtd, J=28,3, 13,8, 6,7 Гц, 12H), 1,43-1,11 (m, 49H), 0,81 (t, J=6,7 Гц, 9H). МС: 697,8 м/з [M+H].

Пример 39 - Соединение 39

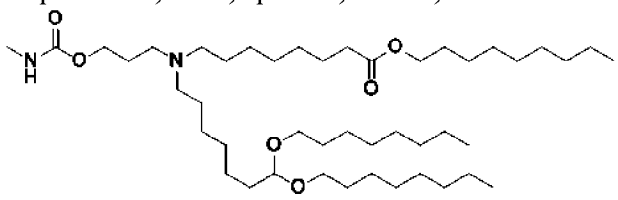
Соединение 39: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-((метилкарбамоил)окси)этил)амино)октаноат



К смеси соединения 10 (1,0 экв.) в толуоле (0,1 М) добавляли метилизоцианат (1,4 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при 23°C с последующим перемешиванием в течение 48 ч при 60 °C. После завершения реакционную смесь разбавляли водой и трижды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои концентрировали и очищали колоночной хроматографией с получением продукта (33%). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 4,44 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,19 (s, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,39 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,79 (d, J=4,9 Гц, 3H), 2,28 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,58 (dp, J=21,1, 7,0 Гц, 13H), 1,31 (ddd, J=23,5, 12,5, 5,9 Гц, 46H), 0,88 (t, J=6,8 Гц, 9H). МС: 742,7 м/з [M+H].

Пример 40 - Соединение 40

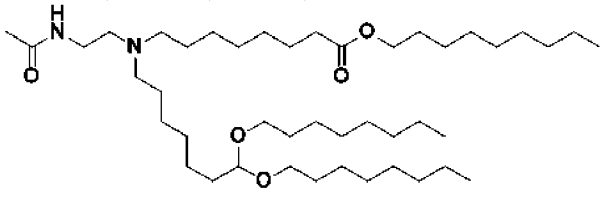
Соединение 40: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(3-((метилкарбамоил)окси)пропил)амино)октаноат



Соединение 40 синтезировали с выходом 34% из соединения 37 с использованием способа, применяемого для соединения 39. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,10 (t, J=6,4 Гц, 2H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,57-3,52 (m, 2H), 3,40 (dt, J=9,4, 6,8 Гц, 2H), 2,79 (d, J=4,8 Гц, 4H), 2,37 (s, 4H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,58 (dp, J=21,2, 7,0 Гц, 13H), 1,30 (ddt, J=17,9, 11,6, 5,7 Гц, 49H), 0,88 (t, J=6,8 Гц, 9H). МС: 756,4 м/з [M+H].

Пример 41 - Соединение 41

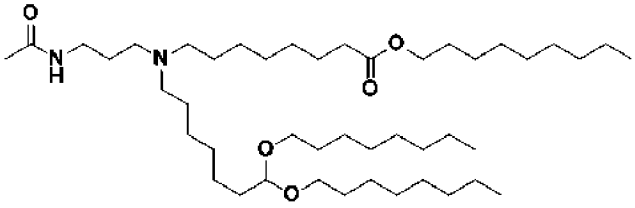
Соединение 41: нонил 8-((2-ацетамидоэтил)(7,7-бис(октилокси)гептил)амино)октаноат



К смеси соединения 36 (1,0 экв.) в ДХМ (0,2 М) добавляли ТЭА (1,1 экв.) и охлаждали до 0 °С. По каплям добавляли ацетилхлорид (1,04 экв.) и смесь перемешивали в течение 4 ч. После завершения реакцию гасили насыщенным раствором бикарбоната натрия и трижды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои концентрировали и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (55%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,44 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,42-3,37 (m, 2H), 3,35 (d, J=13,8 Гц, 2H), 2,56 (d, J=48,6 Гц, 5H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,98 (s, 3H), 1,66-1,41 (m, 15H), 1,41-1,20 (m, 48H), 0,90-0,83 (m, 9H). МС: 740,9 м/з [M+H].

Пример 42 - Соединение 42

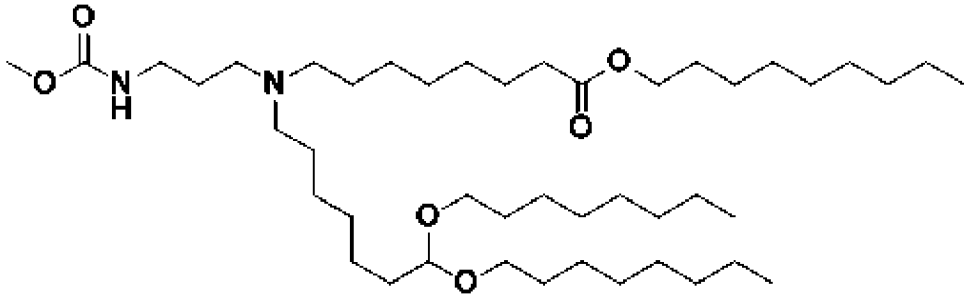
Соединение 42: нонил 8-((3-ацетамидопропил)(7,7-бис(октилокси)гептил)амино)октаноат



Соединение 42 синтезировали с выходом 51% из соединения 38 с использованием способа, применяемого для соединения 41. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,44 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 3,39 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,32 (q, J=5,6 Гц, 2H), 2,52 (t, J=6,0 Гц, 2H), 2,46-2,35 (m, 3H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,93 (s, 3H), 1,68-1,50 (m, 12H), 1,44 (h, J=6,9, 6,1 Гц, 4H), 1,39-1,21 (m, 45H), 0,92-0,84 (m, 9H). МС: 742,7 м/з [M+H].

Пример 43 - Соединение 43

Соединение 43: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(3-((метоксикарбонил)амино)пропил)амино)октаноат

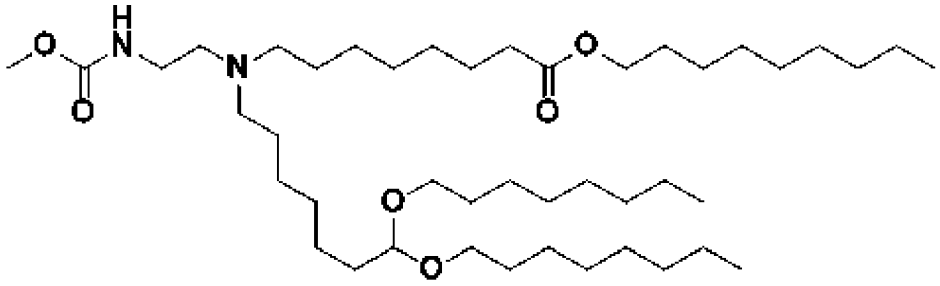


К смеси соединения 38 (1,0 экв.) в ДХМ (0,2 М) добавляли ТЭА (1,1 экв.) и охлаждали до 0 °С. По каплям добавили метилхлорформиат (1,1 экв.) и смесь перемешивали в течение 4 ч. После завершения реакцию гасили насыщенным раствором бикарбоната натрия и трижды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои концентрировали и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (31%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,64 (s, 3H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 3,26 (q, J=6,1 Гц, 2H), 2,41 (d, J=44,1 Гц, 4H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,68-1,50 (m, 13H), 1,50-1,20 (m,

49H), 0,93-0,83 (m, 9H). МС: 756,0 м/з [M+H].

Пример 44 - Соединение 44

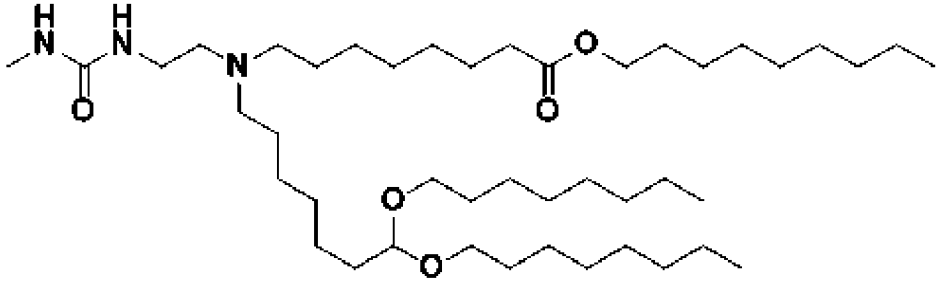
Соединение 44: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-((метоксикарбонил)амино)этил)амино)октаноат



Соединение 44 синтезировали с выходом 56% из соединения 36 с использованием способа, применяемого для соединения 43. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,58-3,50 (m, 2H), 3,40 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 3,21 (s, 2H), 2,44 (d, J=49,2 Гц, 5H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,65-1,50 (m, 11H), 1,48-1,16 (m, 52H), 0,91-0,83 (m, 9H). МС: 742,4 м/з [M+H].

Пример 45 - Соединение 45

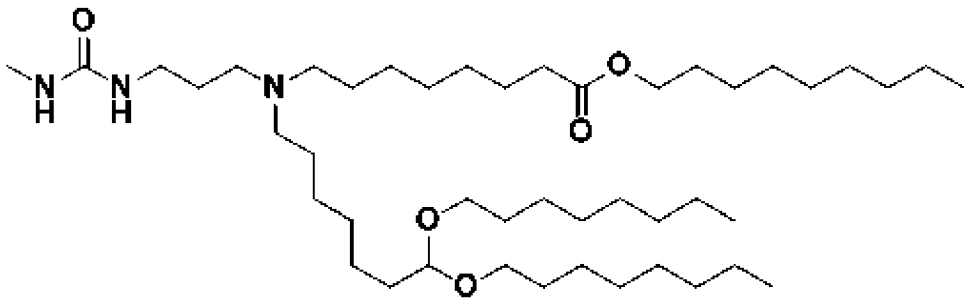
Соединение 45: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-(3-метилуреидо)этил)амино)октаноат



К смеси соединения 36 (1,0 экв.) в толуоле (0,02 М) добавляли метилизоцианат (1,4 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при 23 °C. После завершения реакционную смесь разбавляли водой и трижды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои концентрировали и очищали колоночной хроматографией с получением продукта (23%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 5,20 (s, 1H), 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,27 (d, J=18,4 Гц, 2H), 2,75 (d, J=4,8 Гц, 3H), 2,54 (d, J=51,5 Гц, 5H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,67-1,40 (m, 15H), 1,40-1,19 (m, 46H), 0,92-0,84 (m, 9H). МС: 741,3 м/з [M+H].

Пример 46 - Соединение 46

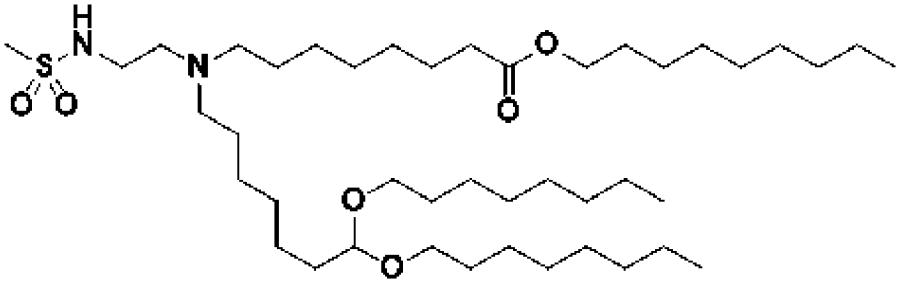
Соединение 46: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(3-(3-метилуреидо)пропил)амино)октаноат



Соединение 46 синтезировали с выходом 24% из соединения 38 с использованием способа, применяемого для соединения 45. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,40 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,25 (h, J=5,0 Гц, 2H), 2,75 (d, J=4,8 Гц, 3H), 2,48 (s, 5H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,73-1,40 (m, 16H), 1,40-1,19 (m, 44H), 0,92-0,83 (m, 9H). МС: 755,0 м/з [M+H].

Пример 47 - Соединение 47

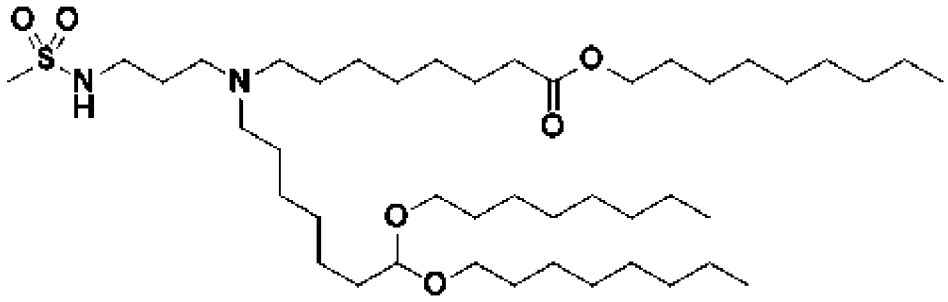
Соединение 47: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(2-(метилсульфонамидо)этил)амино)октаноат



К смеси соединения 36 (1,0 экв.) в ДХМ (0,25 М) добавляли MsCl (10 экв.). Смесь перемешивали в течение 15 минут при 23 °C, затем дважды промывали водой и концентрировали в вакууме. Очистка колоночной хроматографией позволила получить продукт в виде бесцветного остатка (13%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,47 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,08 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,58 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,42 (dt, J=9,4, 6,7 Гц, 2H), 3,22 (s, 1H), 2,98 (s, 3H), 2,60 (d, J=77,4 Гц, 4H), 2,31 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,69-1,42 (m, 15H), 1,42-1,23 (m, 46H), 0,94-0,86 (m, 9H). МС: 762,9 м/з [M+H].

Пример 48 - Соединение 48

Соединение 48: нонил 8-((7,7-бис(октилокси)гептил)(3-(метилсульфонамидо)пропил)амино)октаноат

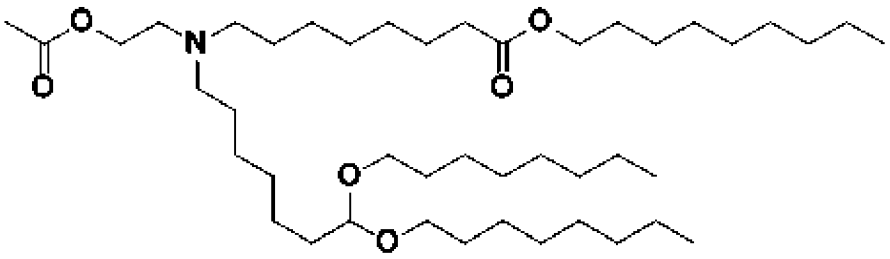


Соединение 48 синтезировали с выходом 16% из соединения 38 с использованием способа, применяемого для соединения 47. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,44 (t, J=5,6 Гц,

1H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,6 Гц, 2H), 3,43-3,32 (m, 4H), 2,97 (s, 7H), 2,29 (t, J=7,4 Гц, 2H), 2,09 (s, 2H), 1,88-1,50 (m, 15H), 1,43-1,18 (m, 41H), 0,97-0,76 (m, 9H). МС: 776,5 м/з [M+H].

Пример 49 - Соединение 49

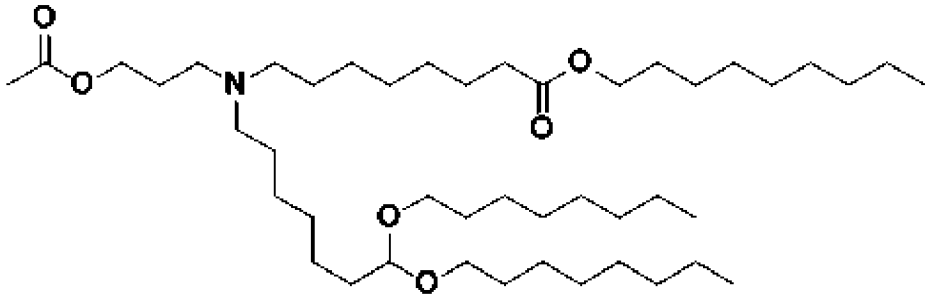
Соединение 49: нонил 8-((2-ацетоксиэтил)(7,7-бис(октилокси)гептил)амино)октаноат



К смеси соединения 10 (1,0 экв.) в пиридине (10 экв.) добавляли уксусный ангидрид (10 экв.). Смесь перемешивали при 23°C в течение 24 часов. После завершения реакцию гасили добавлением воды и трижды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои концентрировали под вакуумом и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (55%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,44 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,14 (q, J=5,8, 5,4 Гц, 2H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 3,39 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,74 (s, 2H), 2,49 (s, 4H), 2,28 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,05 (s, 3H), 1,66-1,50 (m, 11H), 1,50-1,39 (m, 4H), 1,39-1,19 (m, 48H), 0,91-0,84 (m, 9H). МС: 727,4 м/з [M+H].

Пример 50 - Соединение 50

Соединение 50: нонил 8-((3-ацетоксипропил)(7,7-бис(октилокси)гептил)амино)октаноат



Соединение 50 синтезировали с выходом 42% из соединения 37 с использованием способа, применяемого для соединения 49. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,45 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,07 (dt, J=17,3, 6,6 Гц, 4H), 3,55 (dt, J=9,3, 6,6 Гц, 2H), 3,39 (dt, J=9,3, 6,7 Гц, 2H), 2,42 (d, J=38,1 Гц, 5H), 2,28 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,04 (s, 3H), 1,75 (s, 2H), 1,66-1,49 (m, 11H), 1,45-1,21 (m, 52H), 0,91-0,84 (m, 9H). МС: 741,2 м/з [M+H].

Пример 51 - Измерения pKa

pKa каждого аминолипида определяли в соответствии со способом, описанным в Jayaraman, et al. (Angewandte Chemie, 2012) со следующими адаптациями. pKa определяли для исходного аминолипида в этаноле при концентрации 2,94 мМ. Липид разбавляли до 100 мкМ в 0,1 М фосфатном буфере (Boston Bioproducts), в котором pH находился в

диапазоне 4,5-9,0. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием длин волн возбуждения и излучения 321 нм и 448 нм. В таблице 2 представлены измерения pKa для перечисленных соединений.

Таблица 2 - Значения pKa

Соединение	**pKA**
Соединение 1	6,30
Соединение 2	6,23
Соединение 3	6,19
Соединение 4	7,04
Соединение 5	7,08
Соединение 6	6,3
Соединение 7	6,16
Соединение 8	6,37
Соединение 9	6,12
Соединение 10	6,05
Соединение 11	6,35
Соединение 12	6,38
Соединение 13	6,35
Соединение 14	6,46
Соединение 15	6,34
Соединение 16	6,34
Соединение 17	6,21
Соединение 18	6,6
Соединение 19	6,4
Соединение 20	5,81
Соединение 21	5,99
Соединение 22	6,18
Соединение 23	6,04
Соединение 24	5,95
Соединение 25	6,1
Соединение 26	6,19
Соединение 27	6,41
Соединение 28	6,41
Соединение 29	6,54

Соединение 30	6,48
Соединение 31	6,47
Соединение 32	6,36
Соединение 33	6,33
Соединение 34	6,47
Соединение 35	6,37
Соединение 36	7,2
Соединение 37	6,3
Соединение 38	7,81
Соединение 39	не определено
Соединение 40	5,71
Соединение 41	6,82
Соединение 42	7,19
Соединение 43	6,02
Соединение 44	5,62
Соединение 45	не определено
Соединение 46	7,64
Соединение 47	6,93
Соединение 48	7,61
Соединение 49	5,32
Соединение 50	5,45

Пример 52 - Композиции LNP для редактирования in vivo у мышей.

Препараты различных композиций LNP готовили с аминолипидами. В анализах процентного редактирования печени у мышей мРНК Cas9 и химически модифицированная огРНК были составлены в LNP в соотношении 1:1 мас/мас или 1:2 мас/мас. LNP составляют с композицией заданного ионизируемого липида (например, аминолипида), DSPC, холестерина и ПЭГ-2k-ДМГ с соотношением N:P 6,0.

Состав LNP - Перекрестный поток

LNP получали путем струйного смешивания липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липид в этаноле смешивают через узел смешивания с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивается с выходным потоком узла через Т-образное соединение. (*См, например,* WO2016010840, Фиг. 2.) LNP выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об/об). Разбавленные LNP концентрировали, используя тангенциальную поточную фильтрацию, на картридже с плоским листом (Sartorius, HOMM 100 кДа) и затем заменяли буфер путем диафильтрации

на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (мас/об) сахарозы, pH 7,5 (TSS). Альтернативно, окончательный обмен буфера на TSS завершали с помощью обессоливающих колонок PD-10 (GE). При необходимости композиции концентрировали центрифугированием с центробежными фильтрами Amicon 100 кДа (Millipore). Полученную смесь затем фильтровали с использованием 0,2 мкм стерильного фильтра. Конечную LNP хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего использования.

Аналитическое исследование композиции LNP

Динамическое рассеяние света («ДРС») используется для определения индекса полидисперсности («pdi») и размера LNP по данному раскрытию. ДРС измеряет рассеяние света, которое возникает в результате воздействия на образец источника света. Индекс полидисперсности (PDI), как определено из измерений ДРС, представляет собой распределение размера частиц (относительно среднего размера частиц) в популяции, причем совершенно однородная популяция имеет PDI равный нулю.

Электрофоретическое рассеяние света используется для характеристики поверхностного заряда LNP при заданном pH. Поверхностный заряд, или дзета-потенциал, является мерой величины электростатического отталкивания/притяжения между частицами в суспензии LNP.

Фракционирование течением под влиянием асимметричного силового поля - многоугловое рассеяние света (AF4-MALS) используется для разделения частиц в композиции по гидродинамическому радиусу, а затем для измерения молекулярных масс, гидродинамических радиусов и среднеквадратичных радиусов фракционированных частиц. Это позволяет оценивать молекулярно-массовое распределение и распределение частиц по размеру, а также вторичные характеристики, такие как построение Бурхарда-Штокмайера (отношение среднеквадратичного значения радиуса к гидродинамическому радиусу во времени, которое указывает на внутреннюю плотность ядра частицы) и график среднеквадратичной конформации (логарифм среднеквадратичного значения радиуса от логарифма молекулярной массы, где угловой коэффициент полученной линейной аппроксимации дает степень компактности в зависимости от удлинения).

Анализ траекторий движения наночастиц (Nanoparticle tracking analysis - NTA, Malvern Nanosight) можно использовать для определения распределения частиц по размеру, а также концентрации частиц. Образцы LNP разбавляют соответствующим образом и наносят на предметное стекло микроскопа. Камера регистрирует рассеянный свет, когда частицы медленно диффундируют через поле зрения. После записи видео при помощи анализа траекторий движения наночастиц видео обрабатывается, отслеживая пиксели и вычисляя коэффициент диффузии. Этот коэффициент диффузии может быть преобразован в гидродинамический радиус частицы. Прибор также подсчитывает количество отдельных частиц, подсчитанных в анализе, чтобы определить концентрацию частиц.

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

Анализ липидного состава LNP можно определить с помощью жидкостной хроматографии с последующей детекцией заряженного аэрозоля (LC-CAD). Данный анализ может обеспечить сравнение фактического содержания липидов с теоретическим содержанием липидов.

Композиции LNP анализируют на предмет среднего размера частиц, индекса полидисперсности (pdi), общего содержания РНК, эффективности инкапсуляции РНК и дзета-потенциала. Композиции LNP можно дополнительно охарактеризовать с помощью анализа липидов, AF4-MALS, NTA и/или крио-ЭМ. Средний размер частиц и полидисперсность измеряют с помощью динамического рассеяния света (ДРС) с использованием прибора Malvern Zetasizer DLS. Образцы LNP разбавляли буфером ФСБ перед измерением при помощи ДРС. Наряду со среднечисловым диаметром и pdi был зарегистрирован Z-средний диаметр, который представляет собой измерение среднего размера частиц на основе интенсивности. Прибор Malvern Zetasizer также используется для измерения дзета-потенциала LNP. Образцы разбавляют 1:17 (50 мкл на 800 мкл) в 0,1X ФСБ, pH 7,4 перед измерением.

Анализ на основе флуоресценции (Ribogreen®, ThermoFisher Scientific) используется для определения концентрации общей РНК и свободной РНК. Эффективность инкапсуляции рассчитывают как (Общая РНК - Свободная РНК)/Общая РНК. Образцы LNP разбавляют соответствующим образом 1x буфером TE, содержащим 0,2% Triton-X 100, для определения общей РНК или 1x буфером TE для определения свободной РНК. Стандартные кривые получают с использованием исходного раствора РНК, используемого для составления композиций, и разбавленного в 1x буфере TE +/- 0,2% Triton-X 100. Разбавленный краситель RiboGreen® (в соответствии с инструкциями производителя) затем добавляют к каждому из стандартов и образцов и оставляют для инкубации в течение приблизительно 10 минут при комнатной температуре в отсутствие света. Микропланштетный ридер SpectraMax M5 (Molecular Devices) используют для считывания образцов с длинами волн возбуждения, автоматической отсечки и излучения, равными 488 нм, 515 нм и 525 нм, соответственно. Общую РНК и свободную РНК определяют по соответствующим стандартным кривым.

Эффективность инкапсуляции рассчитывают как (Общая РНК - Свободная РНК)/Общая РНК. Ту же процедуру можно использовать для определения эффективности инкапсуляции компонента груза на основе ДНК. Для одноцепочечной ДНК можно использовать краситель Oligreen, а для двухцепочечной ДНК - краситель Picogreen.

AF4-MALS используется для анализа распределения по молекулярным массам и размерам частиц, а также вторичных статистических данных из этих расчетов. LNP разбавляют соответствующим образом и вводят в разделяющий канал AF4 с использованием автоматического пробоотборника ВЭЖХ, где они фокусируются, а затем элюируются экспоненциальным градиентом в перекрестном потоке через канал. Вся жидкость приводится в действие насосом ВЭЖХ и прибором Wyatt Eclipse. Частицы, элюирующиеся из канала AF4, проходят через УФ-детектор, детектор многоуглового

лазерного светорассеяния, детектор квазиупругого рассеяния света и дифференциальный рефрактометрический детектор. Необработанные данные обрабатывают с использованием модели Дебая для определения молекулярной массы и среднеквадратичного радиуса из сигналов детектора.

Липидные компоненты в LNP количественно анализируют с помощью ВЭЖХ с присоединенным детектором заряженных аэрозолей (charged aerosol detector - CAD). Хроматографическое разделение 4 липидных компонентов достигают с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. CAD представляет собой разрушающий масс-детектор, который обнаруживает все нелетучие соединения, и сигнал является постоянным независимо от структуры аналита.

Грузы мРНК Cas9 и гРНК

Груз мРНК Cas9 получали путем транскрипции in vitro Кэппированная и полиаденилированная мРНК Cas9, содержащая 1X NLS (SEQ ID NO: 3) или последовательность из таблицы 24 PCT/US2019/053423 (которая включена в данный документ посредством ссылки), была получена транскрипцией in vitro с использованием линеаризованной плазмидной ДНК-матрицы и T7 РНК-полимеразы. Например, плазмидная ДНК, содержащая промотор T7 и область поли(A/T) размером 100 нуклеотидов, может быть линеаризована путем инкубации при 37°C в течение 2 часов с помощью XbaI в следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 ед/мкл XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI можно инактивировать нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 минут. Линеаризованная плазмида может быть очищена от ферментов и буферных солей с использованием макси спин-колонки с силикагелем (Epoch Life Sciences) и проанализирована с помощью агарозного геля для подтверждения линеаризации. Реакцию IVT с образованием модифицированной мРНК Cas9 можно проводить путем инкубации при 37°C в течение 4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линеаризованной плазмиды; по 2 мМ каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метил псевдо-UTP (Trilink); 10 мМ ARCA (Trilink); 5 ед/мкл T7 РНК-полимеразы (NEB); 1 ед/мкл ингибитора мышиной РНКазы (NEB); 0,004 ед/мкл неорганической пирофосфатазы E. coli (NEB) и 1x реакционный буфер. После инкубации в течение 4 ч добавляли ДНКазу TURBO (ThermoFisher) до конечной концентрации 0,01 ед/мкл и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления матрицы ДНК. мРНК Cas9 очищали методом осаждения LiCl.

огРНК (например, G650; SEQ ID NO: 2) синтезировали химическим путем и необязательно получали от коммерческого поставщика.

LNP

Эти LNP составляли в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. Молярные концентрации липидов в липидном компоненте LNP выражаются в мольных % аминолипида/DSPC/холестерина/ПЭГ-2k-ДМГ, например, 50/10/38,5/1,5. Конечные LNP были охарактеризованы для определения эффективности инкапсуляции, индекса полидисперсности и среднего размера частиц согласно аналитическим способам,

представленным выше. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 3.

Таблица 3 - Анализ композиции

Ионизируемый липид	Композиция	Конц. (мг/мл)	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	1	98	82,71	0,056	64,97
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	0,5	98	79,49	0,105	57,04
Соединение 2	50/10/38,5/1,5	0,5	98	79,89	0,068	59,46
Соединение 3	50/10/38,5/1,5	0,5	98	75,79	0,056	57,41
Соединение 5	50/10/38,5/1,5	0,5	98	83,93	0,099	59,69
Соединение 6	50/10/38,5/1,5	0,5	99	78,59	0,075	58,17

Структура и способ синтеза соединения 19 раскрыты в US 2017/0196809A1, который полностью включен в данный документ.

LNP вводили мышам в однократной дозе 0,1 мг/кг, если не указано иное, и геномную ДНК выделяли для анализа NGS, как описано ниже.

Доставка LNP in vivo

В каждом исследовании использовали самок мышей CD-1 в возрасте 6-10 недель. Животных взвешивали и группировали в соответствии с массой тела для приготовления дозировочных растворов на основе среднегрупповой массы. LNP вводили через латеральную хвостовую вену в объеме 0,2 мл на животное (приблизительно 10 мл на килограмм массы тела). После введения дозы животных периодически наблюдали на предмет побочных эффектов в течение по меньшей мере 24 часов после введения дозы. Животных умерщвляли через 6 или 7 дней путем обескровливания посредством пункции сердца под изофлурановой анестезией. Кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки или в пробирки, содержащие забуференный раствор цитрата натрия, для получения плазмы, как описано в данном документе. Для исследований, включающих в себя редактирование in vivo, у каждого животного отбирали ткань печени для выделения и анализа ДНК.

Когорты мышей измеряли на предмет редактирования печени с помощью секвенирования следующего поколения (Next-Generation Sequencing - NGS).

Секвенирование нового поколения

Вкратце, для количественного определения эффективности редактирования в целевом участке генома выделяли геномную ДНК и использовали глубокое

секвенирование для выявления наличия вставок и делеций, внесенных при редактировании генов.

Праймеры для ПЦР конструировали вокруг целевого сайта (*например*, B2M) и представляющую интерес область генома амплифицировали. Дополнительную ПЦР проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления необходимых химических компонентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Прочтения были выровнены по эталонному геному человека (*например*, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Полученные файлы, содержащие прочтения, были картированы с эталонным геномом (файлы BAM), где были выбраны прочтения, которые перекрывали представляющую интерес целевую область, и было рассчитано число прочтений дикого типа по сравнению с числом прочтений, содержащих вставку, замену или делецию.

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

На Фигуре 1 показан процент редактирования в печени мыши, измеренный с помощью NGS. Как показано на Фигуре 1 и в таблице 4, процент редактирования in vivo варьируется от около 8% до более 35% редактирования печени.

Таблица 4. Эффективность редактирования B2M в печени мыши

Условие	Редактирование (%)	Стандартное отклонение	Количество образцов (n)
TSS	0,0	0,1	5
Соединение 19	12,0	3,2	4
Соединение 1	36,8	7,0	5
Соединение 2	17,7	2,9	5
Соединение 3	8,8	2,0	5
Соединение 5	13,2	2,7	5
Соединение 6	8,2	1,8	5

Пример 53 - Эффект дозы при редактировании в печени

Для оценки масштабируемости дозирования эксперимент доза-ответ проводили in vivo с соединением 1. мРНК Cas9 из примера 52 была составлена в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной либо на TTR (G282; SEQ ID NO: 1), либо на B2M (G650; SEQ ID NO: 2). Эти LNP были составлены в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока с

композициями, как описано в таблице 5. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0 и были использованы в концентрации, описанной в таблице 5, после концентрирования с использованием фильтров Amicon PD-10 (GE Healthcare) в случае необходимости.

Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52.

Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 5.

Таблица 5: Анализ композиций

Ионизируемый липид	**Композиция**	**Инкапсуляция (%)**	**гРНК**	**Концентрация (мг/мл)**	**Z-сред. размер (нм)**	**PDI**	**Числ. сред. размер (нм)**
Соединение 19	50/9/38/3	99	G282	0,05	79,83	0,015	62,86
Соединение 19	50/9/38/3	98	G650	1	82,71	0,056	64,97
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	97	G282	0,043	75,77	0,008	61,19
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	98	G650	0,593	80,96	0,028	65,11

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг или 0,3 мг/кг. Через 6 дней после введения дозы животных умерщвляли. Для животных, которым вводили дозу TTR, нацеленного на G282, производили забор крови и печени и измеряли TTR в сыворотке и редактирование. У животных, которым вводили дозу B2M, нацеленного на G650, производили забор печени и измеряли редактирование.

ИФА транстиретина (TTR)

Кровь отбирали и выделяли сыворотку, как указано. Общие уровни мышиного TTR в сыворотке определяли с использованием набора для ИФА мышиного преальбумина (транстиретина) (Aviva Systems Biology, кат. OKIA00111). Вкратце, сыворотки серийно разбавляли разбавителем образцов из набора до конечного разведения в 10000 раз для дозы 0,1 мг/кг и в 2500 раз для дозы 0,3 мг/кг. Затем разбавленный образец добавляли в планшеты для ИФА, после чего проводили анализ в соответствии с указаниями.

В таблице 6 и на Фигурах 2A-2C показаны результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке. Составы соединения 1 показали более высокое редактирование TTR в печени, чем составы соединения 19, при каждой дозе. Состав соединения 1 показал редактирование TTR в диапазоне 55-60% как при дозе 0,1 мг/кг так и при дозе 0,3 мг/кг, что указывает на эффективность при низких дозах.

Таблица 6: Редактирование TTR в печени и уровни TTR в сыворотке для

зависимости доза-ответ.

Условие	Доза (мг/кг)	Редактирование TTR (%)	Стандартное отклонение редактирования TTR	TTR в сыворотке (мкг/мл)	Стандартное отклонение TTR в сыворотке	TSS	Стандартное отклонение %TSS	Количество образцов (n)
TSS		0,1	0,1	71	0	00	2	5
Соединение 19	0,1	13,8	3,9	55	28	85	7	5
Соединение 19	0,3	45,9	7,8	55	103	3	3	4
Соединение 1	0,1	55,4	4,8	19	82	5	1	5
Соединение 1	0,3	59,3	6,5	5	8	5	2	5

В таблице 7 и на Фигуре 3 показаны результаты редактирования B2M в печени. Соединение 1 показало более высокое редактирование B2M в печени, чем соединение 19, при каждой дозе. Соединение 1 и соединение 19 значительно увеличивали редактирование B2M в печени между дозами 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг.

Таблица 7: Редактирование B2M в печени для зависимости доза-ответ.

Условие	Доза (мг/кг)	Редактирование (%)	Стандартное отклонение	Количество образцов (n)
TSS		0,1	0,1	5
Соединение 19	0,1	25,5	10,1	5
Соединение 19	0,3	43,4	10,1	5
Соединение 1	0,1	41,0	9,0	5
Соединение 1	0,3	62,9	2,3	5

Пример 54 - Редактирование B2M в печени мыши композициями, содержащими соединение 4

Редактирование оценивали с использованием различных доз и концентраций ПЭГ-липидов в композициях, содержащих соединение 4. мРНК Cas9, описанная в примере 52, была составлена в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на B2M (G650; SEQ ID NO: 2). Эти LNP составляли в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока с композициями, как описано в таблице 8. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. Все

LNP концентрировали с использованием фильтров Amicon PD-10 (GE Healthcare) и/или тангенциальной поточной фильтрации и использовали в концентрации, описанной в таблице 8.

Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52.

Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 8.

Таблица 8 - Анализ композиции

Ионизируемый липид	Композиция	Конц. (мг/мл)	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	1	98	82,71	0,056	64,97
Соединение 4	50/10/38,5/1,5	0,5	97	77,33	0,056	58,43

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг или 0,3 мг/кг. Через 7 дней после введения дозы животных умерщвляли, производили забор печени и измеряли редактирование с помощью NGS. В таблице 9 и на Фигуре 4 показаны результаты редактирования B2M в печени. Композиции, содержащие соединение 4, показали повышенное редактирование при дозе 0,3 мг/кг по сравнению с дозой 0,1 мг/кг, как и сравнительная композиция соединения 19.

Пример 9 - Редактирование B2M в печени мыши с использованием соединения 4

Условие	Доза (мг/кг)	% редактирования	Стандартное отклонение	Количество образцов (n)
TSS	-	0	0	5
Соединение 19	0,1	13	6	5
Соединение 19	0,3	44	15	5
Соединение 4	0,1	29	6	5
Соединение 4	0,3	57	7	5

Пример 55 - Редактирование TTR в печени мыши

Редактирование оценивалось для дополнительных композиций. мРНК Cas9, описанную в примере 52, составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP составляли в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока, как описано в примере 52, с композициями, как описано в таблице 10. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. LNP использовали в концентрации, описанной в таблице 10. Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52.

Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания

РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 10.

Таблица 10 - Анализ композиции

Ионизируемый липид	Композиция	Конц. (мг/мл)	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	0,062	98	81,76	0,025	64,95
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	0,057	97	69,94	0,05	55,38
Соединение 7	50/10/38,5/1,5	0,065	92	74,45	0,065	55,7
Соединение 8	50/10/38,5/1,5	0,058	84	87,86	0,085	60,2
Соединение 10	50/10/38,5/1,5	0,069	95	72,36	0,049	55,72

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг. Через 7 дней после введения дозы животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли, как описано выше. В таблице 11 и на Фигуре 5 показаны результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 11

Условие	% редактирования	Стандартное отклонение редактирования	Количество образцов (n)	TTR в сыворотке (мкг/мл)	CO TTR в сыворотке	TTR в сыворотке (%TSS)	CO %TSS	Количество образцов (n)
TSS	0	0	5	1136	159	100	14	5
Соединение 19	29	5	5	528	231	46	20	5
Соединение 1	43	5	5	391	80	34	7	5
Соеди	50	4	5	234	54	21	5	4

нение 7								
Соединение 8	43	8	5	387	83	34	7	5
Соединение 10	50	7	5	206	46	18	4	4

Каждый аминолипид формулы (I) или формулы (II), испытанный в этом примере, показал редактирование TTR приблизительно 40-50% с соответствующим снижением уровней TTR в сыворотке на приблизительно 80%. Эти LNP выгодно отличались от эталонных.

Пример 56 - Редактирование TTR в печени мыши

Редактирование оценивалось для дополнительных составов аминолипидов. мРНК Cas9 из примера 52 составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G282; SEQ ID NO: 1). LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока, как описано в примере 52, с композициями, как описано в таблице 12. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. LNP использовали в концентрации около 0,06 мг/мл. Составы LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 12.

Таблица 12 - Анализ составов

Ионизируемый липид	Соотношение композиции	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	97	79,18	0,047	63,19
Соединение 18	50/10/38,5/1,5	81	106,6	0,112	69,77
Соединение 5	50/10/38,5/1,5	98	108,1	0,273	48,59

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг. Через 7 дней после введения дозы животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли, как описано выше. В таблице 13 представлены результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 13 - Редактирование уровней TTR в печени и сыворотке мышей

Условие	Редактирование (%)	СО редактирования	TTR в сыворотке мкг/мл	СО TTR в сыворотк	TTR в сыворотке (%TSS)	СО %TSS	Количество образцов

				e			(n)
TSS	0	0	801	115	100	14	5
Соединение 19	15	9	865	197	108	25	5
Соединение 18	33	8	415	95	52	12	5
Соединение 5	9	3	738	122	92	15	5

Пример 57 - Измерение экспрессированного белка

В случае груза мРНК экспрессия белка является одним из показателей доставки липидной наночастицей. Например, ИФА можно использовать для измерения уровней белка в биологических образцах для широкого спектра белков. Следующий протокол можно использовать для измерения экспрессированного белка, например, экспрессии белка Cas9, в биологических образцах. Вкратце, общую концентрацию белка в очищенном клеточном лизате определяют с помощью анализа с бицинхониновой кислотой. 96-луночный планшет MSD GOLD Streptavidin SECTOR (Meso Scale Diagnostics, кат. L15SA-1) готовят в соответствии с протоколом производителя с использованием мышиного антитела Cas9 (Origene, кат. CF811179) в качестве захватывающего антитела и мышиного mAb Cas9 (7A9-3A3) (Cell Signaling Technology, кат. 14697) в качестве детектирующего антитела. Рекомбинантный белок Cas9 используется в качестве калибровочного стандарта в Diluent 39 (Meso Scale Diagnostics) со смесью ингибиторов протеаз, не содержащей ЭДТК 1X Halt™ (ThermoFisher, кат. 78437). Планшеты для ИФА считывают с помощью прибора Meso Quickplex SQ120 (Meso Scale Discovery), а данные анализируют с помощью программного пакета Discovery Workbench 4.0 (Meso Scale Discovery).

Пример 58 - Редактирование TTR в печени мыши

Редактирование оценивалось для дополнительных композиций. мРНК Cas9, описанную в примере 52, составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP составляли в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока, как описано в примере 52, с композициями, как описано в таблице 14. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. LNP использовали в концентрации, описанной в таблице 14. Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 14.

Таблица 14 - Анализ композиции

Соединение	Композиция	Конц. (мг/мл)	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	0,05	99	84,99	0,007	71,1
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	0,057	97	69,94	0,05	55,38
Соединение 11	50/10/38,5/1,5	0,074	86	89,3	0,137	54,58
Соединение 12	50/10/38,5/1,5	0,073	98	75,44	0,014	62,44
Соединение 13	50/10/38,5/1,5	0,07	98	77,34	0,04	63,34
Соединение 14	50/10/38,5/1,5	0,078	98	82,2	0,039	65,34
Соединение 15	50/10/38,5/1,5	0,081	88	82,93	0,092	57,97
Соединение 16	50/10/38,5/1,5	0,054	78	109,5	0,132	66,66
Соединение 17	50/10/38,5/1,5	0,071	91	68,72	0,056	54,25

Пяти самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг для каждого условия. Через 6 дней после введения дозы животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли, как описано выше. В таблице 15 и на Фигуре 6 показаны результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 15 - Редактирование уровней TTR в печени и сыворотке мышей

	Редактирование		TTR в сыворотке			
Соединение	Средний % вставки/делеции	CO	TTR в сыворотке (мкг/мл)	CO	%TSS	N
TSS	0,1	0,0	989	248	100%	5
Соединение 19	29,7	7,1	581	180	59%	5
Соединение 19	19,7	6,4	695	69	70%	5
Соединение	29,5	6,5	656	98	66%	5

1						
Соединение 11	29,4	8,6	553	41	56%	5
Соединение 12	33,0	8,3	490	176	50%	5
Соединение 13	22,6	6,0	703	233	71%	5
Соединение 14	12,1	1,9	928	134	94%	5
Соединение 15	50,3	4,6	179	68	18%	5
Соединение 16	35,2	14,1	516	264	52%	5
Соединение 17	40,8	9,4	479	204	48%	5

Пример 59 - Редактирование TTR в печени мыши

Редактирование оценивалось для дополнительных композиций. мРНК Cas9, описанную в примере 52, составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP составляли в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока, как описано в примере 52, с композициями, как описано в таблице 16. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. LNP использовали в концентрации около 0,05 мг/мл. Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 16.

Таблица 16 - Анализ композиции

Соединение	Композиция	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	98	86,84	0,02	71,49
Соединение 18	50/10/38,5/1,5	98	75,79	0,093	53,06
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	96	72,21	0,04	57,78
Соединение 10	50/10/38,5/1,5	98	73,31	0,044	57,14
Соединение 20	50/10/38,5/1,5	83	84,49	0,102	58,65

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг. Через 7 дней после введения дозы

животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли, как описано выше. В таблице 17 и на Фигуре 7 показаны результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 17 - Редактирование уровней TTR в печени и сыворотке мышей

Соединение	Редактирование			TTR в сыворотке			
	Средний % вставки/делеции	CO	N	TTR в сыворотке (мкг/мл)	CO	%TSS	N
TSS	0,1	0,0	5	933	95	100%	5
Соединение 19	29,3	7,1	5	438	139	47%	5
Соединение 18	41,6	12,8	5	324	39	35%	4
Соединение 1	41,6	17,4	5	327	287	35%	5
Соединение 10	60,1	5,9	5	80	70	9%	3
Соединение 20	35,0	8,7	5	210	85	23%	3

Пример 60 - Редактирование TTR в печени мыши

Редактирование оценивалось для дополнительных композиций. мРНК Cas9, описанную в примере 52, составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G502; SEQ ID NO: 4). Эти LNP составляли в соотношении 1:2 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока, как описано в примере 52, с композициями, как описано в таблице 18. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. LNP использовали в концентрации около 0,05. Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 18.

Таблица 18 - Анализ композиции

Соединение	Композиция	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	99	88,6	0,033	73,15
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	97	74,5	0,037	58,01
Соединение 22	50/10/38,5/1,5	98	82,91	0,029	66,68

Соединение 23	50/10/38,5/1,5	93	79,04	0,054	61,86
Соединение 25	50/10/38,5/1,5	92	66,83	0,065	50,74

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг. Через 6 дней после введения дозы животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли, как описано выше. В таблице 19 и на Фигуре 8 показаны результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 19 - Редактирование уровней TTR в печени и сыворотке мышей

Соединение	Редактирование		TTR в сыворотке			
	Средний % вставки/делеции	CO	TTR в сыворотке (мкг/мл)	CO	%TSS	N
TSS	0,2	0,3	1422	325	100%	5
Соединение 19	41,4	5,5	517	153	36%	5
Соединение 1	46,3	13,0	353	170	25%	5
Соединение 22	45,6	11,8	410	186	29%	5
Соединение 23	53,6	8,4	307	128	22%	5
Соединение 25	15,3	11,2	985	290	69%	5

Пример 61 - Редактирование TTR в печени мыши

Редактирование оценивалось для дополнительных композиций. мРНК Cas9, описанную в примере 52, составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP составляли в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока, как описано в примере 52, с композициями, как описано в таблице 20. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. LNP использовали в концентрации, описанной в таблице 20. Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 20.

Таблица 20 - Анализ композиции

Соединение	Композиция	Конц. (мг/мл)	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер

						(нм)
Соединение 19	50/9/38/3	0,05	98	86,84	0,02	71,49
Соединение 18	50/10/38,5/1,5	0,04	90	74,67	0,083	52,25
Соединение 4	50/10/38,5/1,5	0,05	97	87,27	0,051	68,75
Соединение 9	50/10/38,5/1,5	0,05	97	75,32	0,021	60,79
Соединение 10	50/10/38,5/1,5	0,05	94	76,35	0,059	57,86
Соединение 26	50/10/38,5/1,5	0,05	99	63,25	0,07	48,37

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг. Через 7 дней после введения дозы животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли, как описано выше. В таблице 21 и на Фигуре 9 показаны результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 21 - Редактирование уровней TTR в печени и сыворотке мышей

Соединение	Редактирование		TTR в сыворотке			N
	Средний % вставки/делеции	CO	TTR в сыворотке (мкг/мл)	CO	%TSS	
TSS	0,9	0,3	1282	248	100%	5
Соединение 19	35,9	6,6	438	132	34%	5
Соединение 18	26,8	3,9	615	87	48%	5
Соединение 4	46,7	9,7	333	146	26%	5
Соединение 9	52,1	3,1	218	72	17%	5
Соединение 10	47,2	10,8	330	146	26%	5
Соединение 26	2,6	1,1	979	177	76%	5

Пример 62 - Эффект дозы при редактировании в печени

Для оценки масштабируемости дозирования эксперимент доза-ответ был проведен in vivo. мРНК Cas9 из примера 52 составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP составляли в соотношении 1:2 по массе одиночной

гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока с композициями, как описано в таблице 22. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0 и были использованы в концентрации, описанной в таблице 22, после концентрирования с использованием фильтров Amicon PD-10 (GE Healthcare) в случае необходимости.

Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (pdi), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 22.

Таблица 22: Анализ композиций

Соединение	Композиция	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	99	88,6	0,033	73,15
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	97	74,5	0,037	58,01
Соединение 10	50/10/38,5/1,5	92	79,49	0,072	59,35
Соединение 15	50/10/38,5/1,5	89	90,22	0,051	69,95
Соединение 17	50/10/38,5/1,5	94	62,89	0,072	44,93

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг или 0,03 мг/кг. Через 7 дней после введения дозы животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли. В таблице 23 и на Фигуре 10 показаны результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 23: Редактирование TTR в печени и уровни TTR в сыворотке для зависимости доза-ответ

		Редактирование			TTR в сыворотке			
Соединение	Доза (мг/кг)	Средний % вставки/делеции	CO	N	TTR в сыворотке (мкг/мл)	CO	%TSS	N
TSS	TSS	0,1	0,0	5	638	176	100 %	5
Соединение 19	0,03	7,0	5,0	5	560	102	88%	5
Соединение 19	0,1	27,1	14,9	5	414	167	65%	5
Соединение	0,03	8,9	4,8	5	594	271	93%	5

1								
Соединение 1	0,1	34,2	9,9	5	241	45	38%	4
Соединение 10	0,03	15,6	6,6	5	424	142	67%	5
Соединение 10	0,1	51,3	3,9	5	179	42	28%	5
Соединение 15	0,03	16,4	6,6	4	548	188	86%	4
Соединение 15	0,1	57,4	6,6	5	180	33	28%	4
Соединение 17	0,03	4,0	1,4	5	495	98	78%	5
Соединение 17	0,1	45,9	9,2	5	304	82	48%	5

Пример 63 - Редактирование TTR в печени мыши

Редактирование оценивалось для дополнительных композиций. мРНК Cas9, описанную в примере 52, составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP составляли в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока, как описано в примере 52, с композициями, как описано в таблице 24. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. LNP использовали в концентрации, описанной в таблице 24. Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 24.

Таблица 24 - Анализ композиций

Соединение	Композиция	Конц. (мг/мл)	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	0,05	98%	82	0,03	66
Соединение 1	50/10/38,5/1,5	0,06	98%	70	0,06	52

Соединение 27	50/10/38,5/1,5	0,06	94%	80	0,13	54
Соединение 28	50/10/38,5/1,5	0,06	97%	78	0,30	42
Соединение 29	50/10/38,5/1,5	0,06	91%	118	0,17	68
Соединение 30	50/10/38,5/1,5	0,06	93%	108	0,16	61

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг. Через 7 дней после введения дозы животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли, как описано выше. В таблице 25 представлены результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 25 - Редактирование уровней TTR в печени и сыворотке мышей

Соединение	Редактирование			TTR в сыворотке			N
	Доза (мг/кг)	Средний % вставки/делеции	CO	TTR в сыворотке (мкг/мл)	CO	% TSS	
TSS	н/д	0,06	0,05	807,03	161,51	100,00	5
Соединение 19	0,03	30,18	7,90	593,01	268,33	73,48	5
	0,1	56,02	6,27	134,54	61,46	16,67	5
Соединение 1	0,03	10,86	1,36	741,05	125,46	91,82	5
	0,1	41,10	14,39	351,76	126,24	43,59	5
Соединение 27	0,03	27,86	3,69	497,99	115,29	61,71	5
	0,1	57,10	1,99	197,22	49,71	24,44	5
Соединение 28	0,03	20,74	3,72	493,60	57,20	61,16	5
	0,1	42,36	4,36	321,26	58,34	39,81	5
Соединени	0,03	5,76	2,94	718,48	57,4	89,03	5

е 29					0		
	0,1	15,96	3,94	660,46	142,13	81,84	5
Соединение 30	0,03	27,64	3,50	514,23	34,52	63,72	5
	0,1	62,48	5,87	125,89	61,45	15,60	5

Пример 64 - Редактирование TTR в печени мыши

Редактирование оценивалось для дополнительных композиций. мРНК Cas9, описанную в примере 52, составляли в виде LNP с гидовой РНК, нацеленной на TTR (G282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP составляли в соотношении 1:1 по массе одиночной гидовой РНК и мРНК Cas9. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока, как описано в примере 52, с композициями, как описано в таблице 26. Все LNP имели соотношение N:P равное 6,0. LNP использовали в концентрации, описанной в таблице 26. Композиции LNP анализировали на предмет среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК, как описано в примере 52. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в таблице 26.

Таблица 26 - Анализ композиций

Соединение	Композиция	Конц. (мг/мл)	Инкапсуляция (%)	Z-сред. размер (нм)	PDI	Числ. сред. размер (нм)
Соединение 19	50/9/38/3	1,48	98%	83	0,03	65
Соединение 10	50/10/38,5/1,5	0,06	92%	77	0,05	58
Соединение 42	50/10/38,5/1,5	0,06	97%	122	0,05	99
Соединение 41	50/10/38,5/1,5	0,06	95%	92	0,05	70
Соединение 44	50/10/38,5/1,5	0,06	59%	185	0,25	92
Соединение 43	50/10/38,5/1,5	0,06	94%	74	0,05	56
Соединение 46	50/10/38,5/1,5	0,06	98%	104	0,03	86

Соединение 40	50/10/38,5/1,5	0,06	96%	83	0,06	64
	50/10/38,5/1,5	0,06	100%	57	0,06	43
	50/10/38,5/1,5	0,06	90%	88	0,05	69

Самкам мышей CD-1 в/в вводили дозу 0,1 мг/кг. Через 7 дней после введения дозы животных умерщвляли. Производили забор крови и печени, а TTR в сыворотке и редактирование измеряли, как описано выше. В таблице 27 представлены результаты редактирования TTR в печени и уровней TTR в сыворотке.

Таблица 27 - Редактирование уровней TTR в печени и сыворотке мышей

	Редактирование			TTR в сыворотке			
Соединение	Доза (мг/кг)	Средний % вставки/делеции	CO	TTR в сыворотке (мкг/мл)	CO	TTR в сыворотке (%KD)	N
TSS	н/д	0,2	0,05	572,6	13,01		5
Соединение 19	0,03	5,2	1,28	622,0	8,11	-8,6	5
Соединение 10	0,03	27,2	5,15	409,2	22,35	28,5	5
Соединение 42	0,03	9,6	5,66	571,6	11,40	0,2	5
Соединение 41	0,03	2,4	0,85	567,1	9,10	1,0	5
Соединение 44	0,03	7,9	3,59	603,9	6,53	-5,5	5
Соединение 43	0,03	8,6	2,04	619,2	14,61	-8,1	5
Соединение 46	0,03	8,7	3,82	514,6	7,69	10,1	5
Соединение 40	0,03	27,5	12,31	417,0	21,05	27,2	

Таблица последовательностей

Описание	**Последовательность**	**SE**

		Q ID NO:
G000282 огRNA, нацеленная на TTR мыши	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	11
G000650 огRNA, нацеленная на B2M человека	mG*mA*mC*AAGCACCAGAAAGACCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	22
мРНК, кодирующая Cas9	GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACU	33

	UCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUG CAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAA CCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUG AGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGC ACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAAC ACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGA CCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAG GAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCG AUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGG UCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAG AACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACC UGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCG AAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGA CCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGAC AAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUC GAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCU UCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCG AACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGA AUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGU ACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGC GGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGA AGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCG AAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUG GGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAA GGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGG AAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACC UGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAG AAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUG AUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAA UCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGA	

	AACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUU CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGG GAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGA AGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAA GGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACAC AAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAA ACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGA AAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUG GGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACAC ACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGC AGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGA CAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCG UCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAAC AAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUG AAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAG AGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCA UCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAA GCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCA GAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAA CAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACG ACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAU CGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACA UCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGA CUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAA	

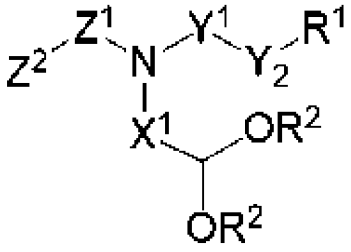
	GAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACA GCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAG CAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUC ACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGA UCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAA GAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGU UCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAG CGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGC CGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAAC AGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUG GACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGA GAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGA ACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAA ACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACA ACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAG UCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGG AGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC UAGCUAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCA UGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUA UUCAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAAC ACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUUAAUCAUUUU GCCUCUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAAUGGA AAGAACCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AUCUAG	
G000502 orRNA, нацеленная на TTR мыши	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	44

2'-O-метиловые модификации и фосфоротиоатные связи, как представлено ниже

(m=2’-OMe; * = фосфоротиоат)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)

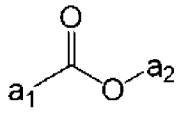
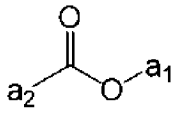


(I)

где, независимо для каждого случая

X^1 представляет собой C_{5-11} алкилен;

Y^1 представляет собой C_{3-11} алкилен;

Y^2 представляет собой  или  , где a_1 представляет собой связь с Y^1, а a_2 представляет собой связь с R^1,

Z^1 представляет собой C_{2-4} алкилен;

Z^2 выбирают из -OH, $-NH_2$, $-OC(=O)R^3$, $-OC(=O)NHR^3$, $-NHC(=O)NHR^3$ и $-NHS(=O)_2R^3$,

R^1 представляет собой C_{4-12} алкил или C_{3-12} алкенил,

каждый R^2 независимо представляет собой C_{4-12} алкил; и

R^3 представляет собой C_{1-3} алкил

или его соль.

2. Соединение по п. 1, в котором соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

3.Соединение по п. 1 или 2, в котором X^1 представляет собой линейный C_{5-11} алкилен.

4.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором X^1 представляет собой линейный C_{6-10} алкилен.

5.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором X^1 представляет собой линейный C_6 алкилен, линейный C_7 алкилен, линейный C_8 алкилен или линейный C_9 алкилен.

6.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Y^1 представляет собой линейный C_{4-9} алкилен.

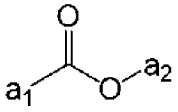
7.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Y^1 представляет собой линейный C_{6-8} алкилен.

8.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Y^1 представляет собой линейный C_7 алкилен.

9.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором R^1 представляет собой C_{4-12} алкенил.

10.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором R^1 представляет

собой C_9 алкенил.

11.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Y^2 представляет собой  .

12.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Y^1, Y^2 и R^1 выбирают для образования линейной цепи из 16-21 атомов.

13.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Y^1, Y^2 и R^1 выбирают для образования линейной цепи из 16-18 атомов.

14.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Z^1 представляет собой линейный C_{2-4} алкилен.

15.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Z^1 представляет собой C_2 алкилен или C_3 алкилен.

16.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором Z^2 представляет собой -OH.

17.Соединение по любому из пп. 1-15, в котором Z^2 представляет собой- NH_2.

18.Соединение по любому из пп. 1-15, в котором Z^2 представляет собой $-OC(=O)R^3$, $-OC(=O)NHR^3$, $-NHC(=O)NHR^3$ или $-NHS(=O)_2R^3$.

19.Соединение по п. 18, в котором R^3 представляет собой метил.

20.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором R^1 представляет собой линейный C_{4-12} алкил.

21.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором R^1 представляет собой линейный C_{8-10} алкил.

22.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором R^1 представляет собой линейный C_9 алкил.

23.Соединение по любому из пп. 1-19, в котором R^1 представляет собой разветвленный C_{6-12} алкил.

24.Соединение по п. 23, в котором R^1 представляет собой разветвленный C_8 алкил, разветвленный C_9 алкил или разветвленный C_{10} алкил.

25.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором каждый R^2 независимо представляет собой линейный C_{5-12} алкил.

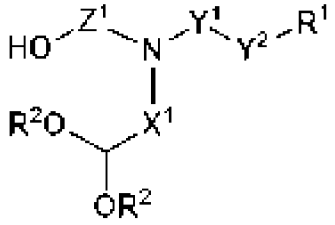
26.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором каждый R^2 независимо представляет собой линейный C_{6-8} алкил.

27.Соединение по любому из пп. 1-24, в котором каждый R^2 независимо представляет собой разветвленный C_{5-12} алкил.

28.Соединение по п. 27, в котором каждый R^2 независимо представляет собой разветвленный C_{6-8} алкил.

29.Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором X^1 и один из фрагментов R^2 выбирают для образования линейной цепи из 16-18 атомов, включая атомы углерода и кислорода ацеталя.

30. Соединение по п. 1, в котором соединение представляет собой соединение формулы (II)

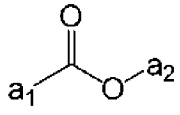
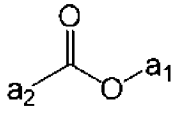


(II),

где, независимо для каждого случая

X^1 представляет собой C_{5-11} алкилен;

Y^1 представляет собой C_{3-10} алкилен;

Y^2 представляет собой  или  , где a_1 представляет собой связь с Y^1, а a_2 представляет собой связь с R^1,

Z^1 представляет собой C_{2-4} алкилен;

R^1 представляет собой C_{4-12} алкил или C_{3-12} алкенил,

каждый R^2 независимо представляет собой C_{4-12} алкил

или его соль.

31. Соединение по п. 30, в котором соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

32. Соединение по п. 30 или 31, в котором X^1 представляет собой линейный C_{5-11} алкилен.

33. Соединение по п. 32, в котором X^1 представляет собой линейный C_{6-8} алкилен.

34.Соединение по п. 33, в котором X^1 представляет собой линейный C_7 алкилен.

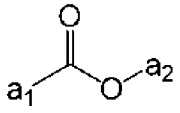
35. Соединение по любому из пп. 30-34, в котором Y^1 представляет собой линейный C_{4-9} алкилен.

36.Соединение по любому из пп. 30-35, в котором Y^1 представляет собой линейный C_{5-9} алкилен.

37. Соединение по любому из пп. 30-36, в котором Y^1 представляет собой линейный C_{6-8} алкилен.

38. Соединение по любому из пп. 30-37, в котором Y^1 представляет собой линейный C_7 алкилен.

39. Соединение по любому из пп. 30-38, в котором Y^2 представляет собой



.

40. Соединение по любому из пп. 30-39, в котором R^1 представляет собой C_{4-12} алкенил.

41. Соединение по любому из пп. 30-40, в котором R^1 представляет собой C_9

алкенил.

42.Соединение по любому из пп. 30-41, в котором Y^1, Y^2 и R^1 выбирают для образования линейной цепи из 16-21 атомов.

43.Соединение по любому из пп. 30-42, в котором Y^1, Y^2 и R^1 выбирают для образования линейной цепи из 16-18 атомов.

44. Соединение по любому из пп. 30-43, в котором Z^1 представляет собой линейный C_{2-4} алкилен.

45. Соединение по любому из пп. 30-44, в котором Z^1 представляет собой C_2 алкилен.

46. Соединение по любому из пп. 30-39 и 42-45, в котором R^1 представляет собой линейный C_{4-12} алкил.

47. Соединение по любому из пп. 30-39 и 42-46, в котором R^1 представляет собой линейный C_{8-10} алкил.

48. Соединение по любому из пп. 30-39 и 42-47, в котором R^1 представляет собой линейный C_9 алкил.

49.Соединение по любому из пп. 30-48, в котором каждый R^2 представляет собой C_{5-12} алкил.

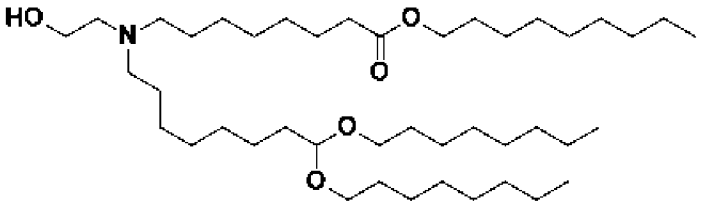
50. Соединение по любому из пп. 30-49, в котором каждый R^2 представляет собой линейный C_{5-12} алкил.

51. Соединение по любому из пп. 30-50, в котором каждый R^2 представляет собой линейный C_{6-10} алкил.

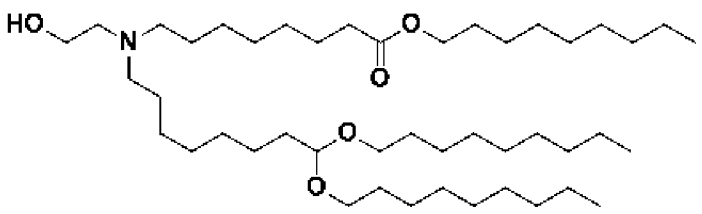
52. Соединение по любому из пп. 30-51, в котором каждый R^2 представляет собой линейный C_{6-8} алкил.

53.Соединение по любому из пп. 30-52, в котором X^1 и один из фрагментов R^2 выбирают для образования линейной цепи из 16-18 атомов, включая атомы углерода и кислорода ацеталя.

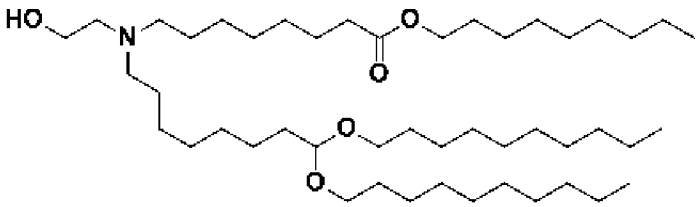
54. Соединение по п. 1, в котором соединение выбрано из:



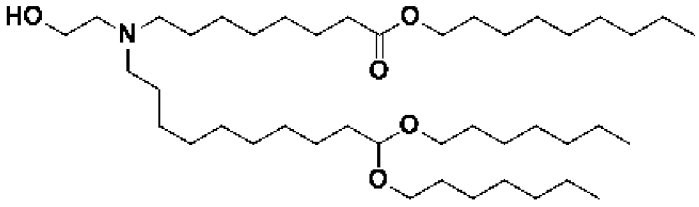
,



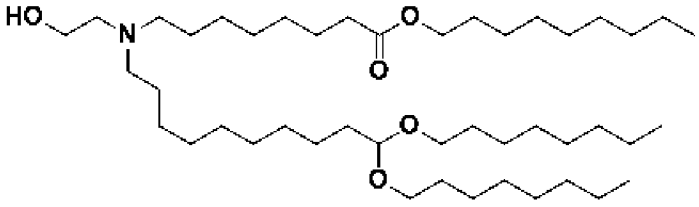
,



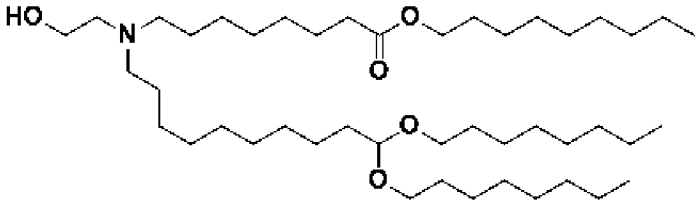
,



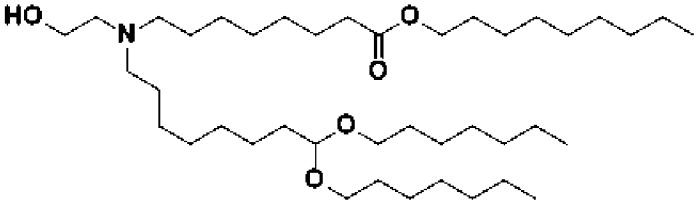
,



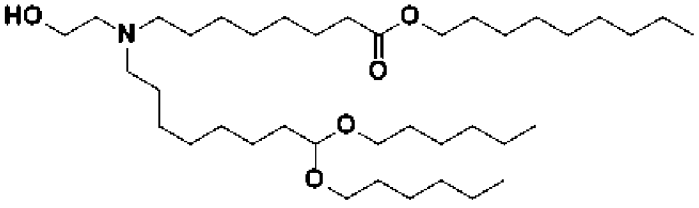
,



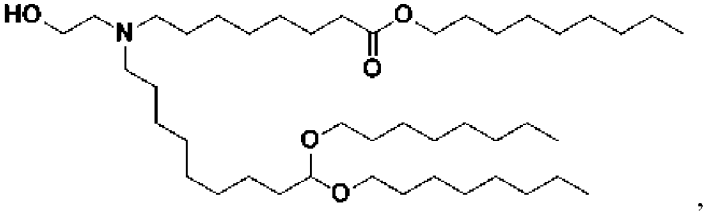
,



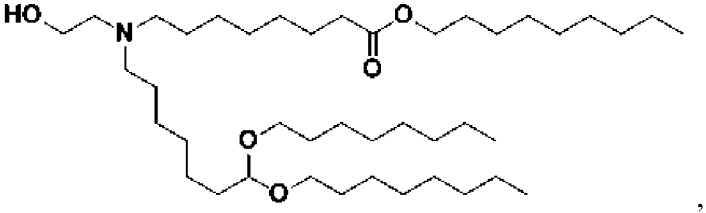
,



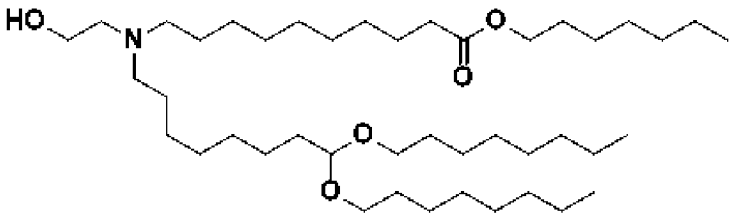
,



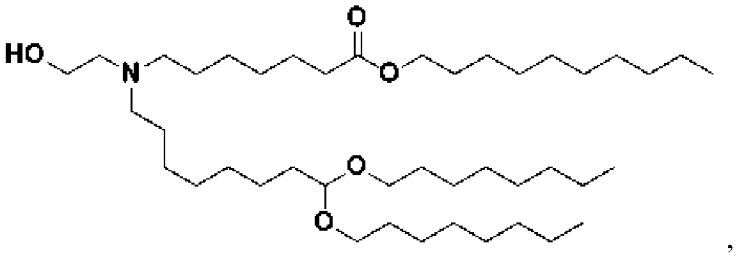
,



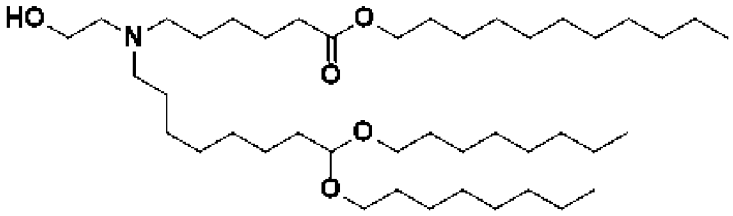
,



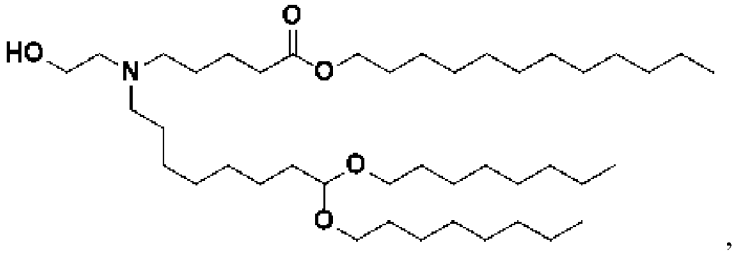
,



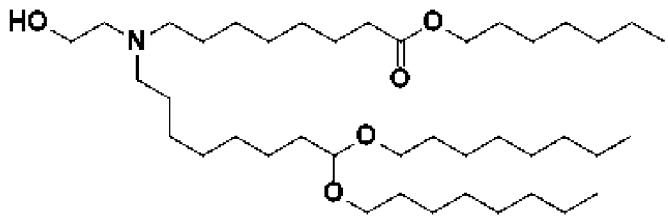
,



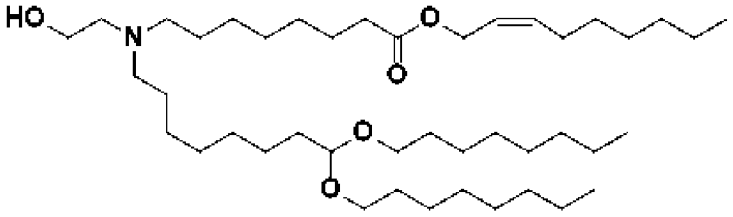
,



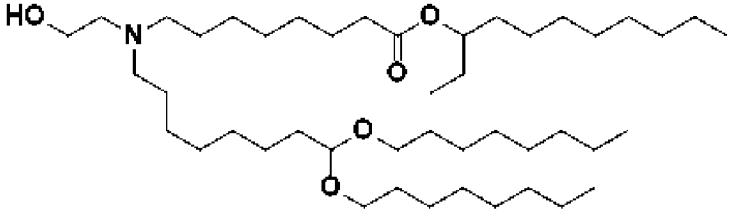
,



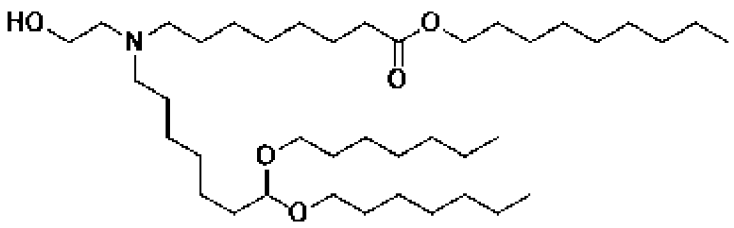
,



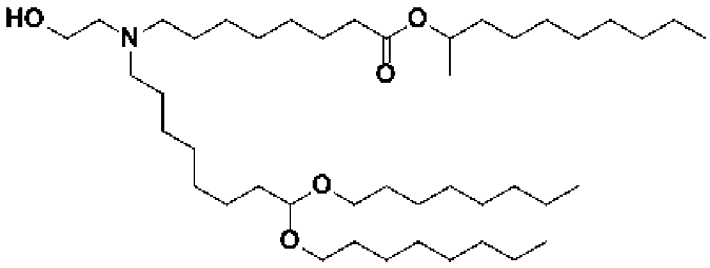
,



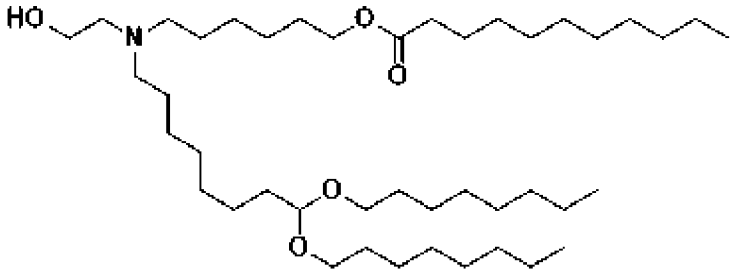
,



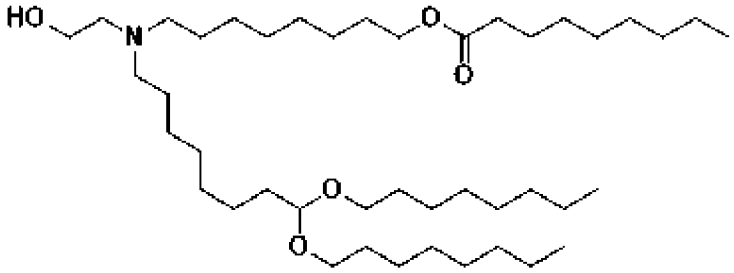
,



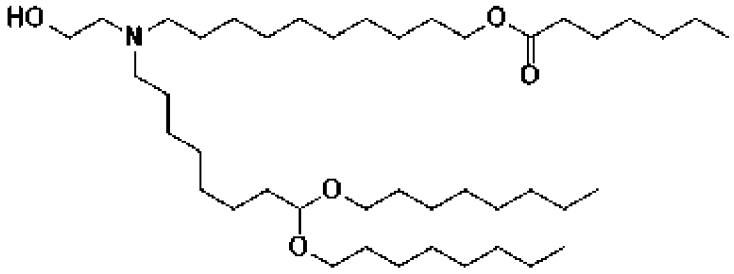
,



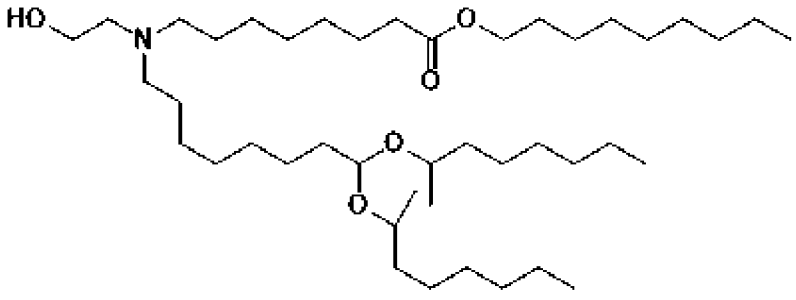
,



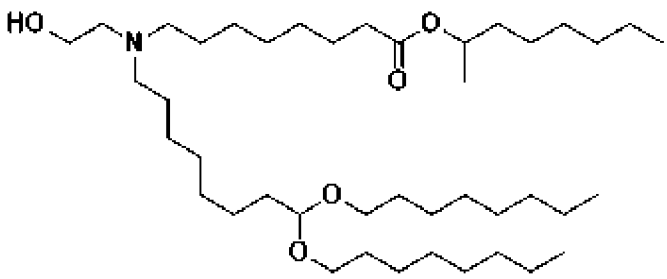
,



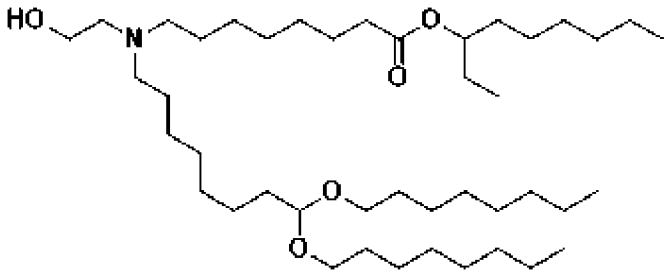
,



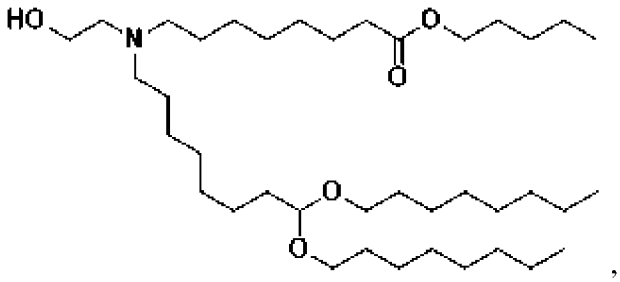
,



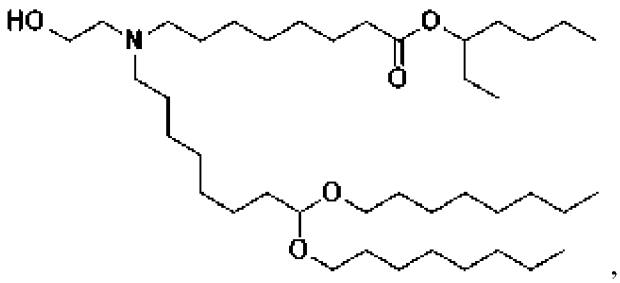
,



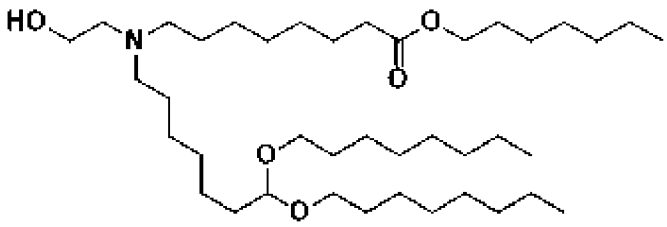
,



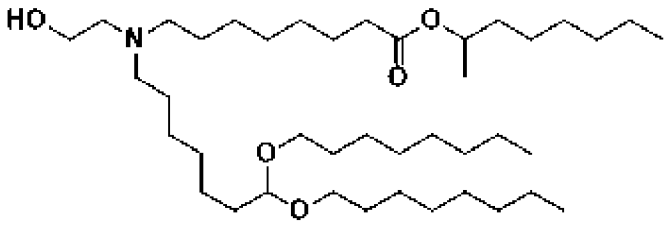
,



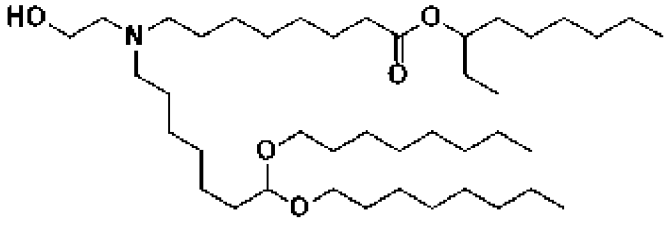
,



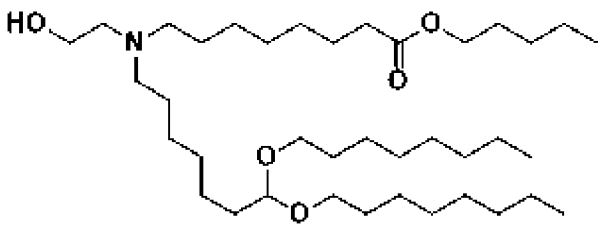
,



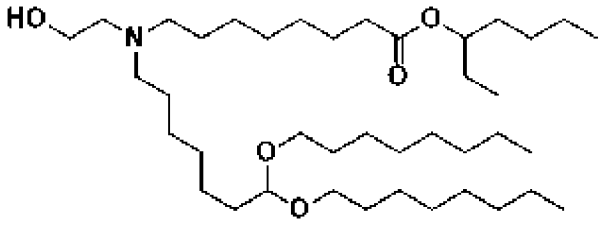
,



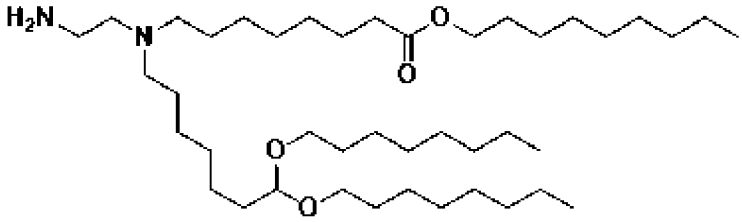
,



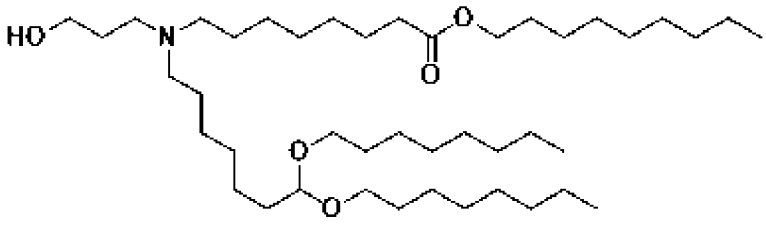
,



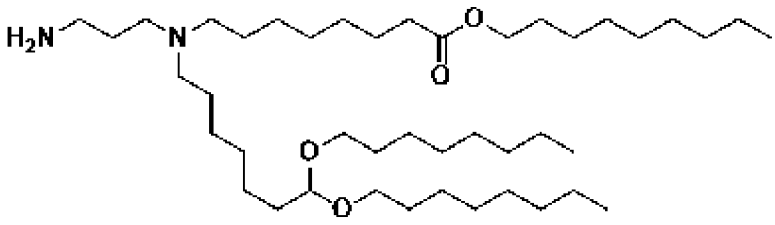
,



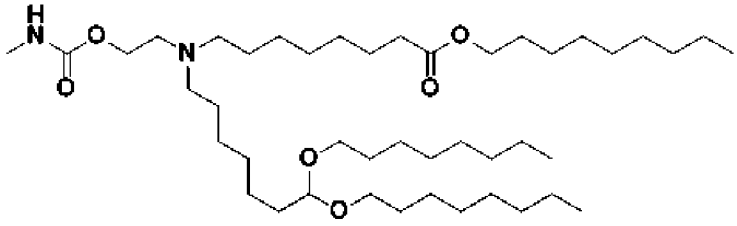
,



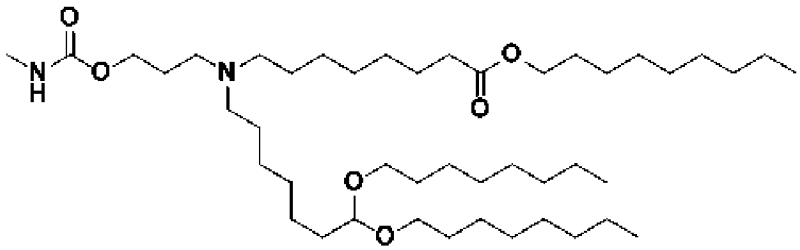
,



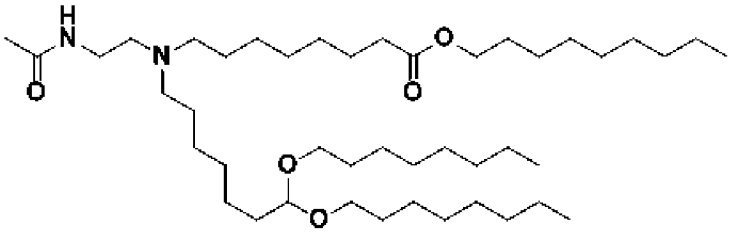
,



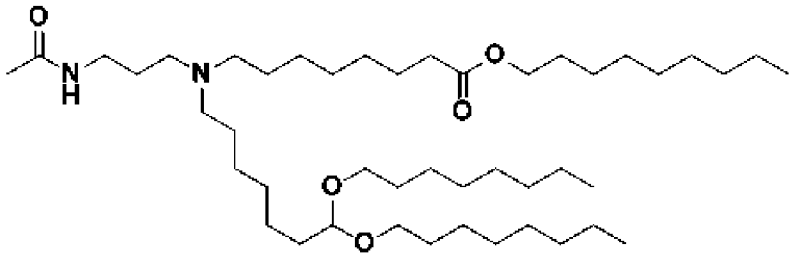
,



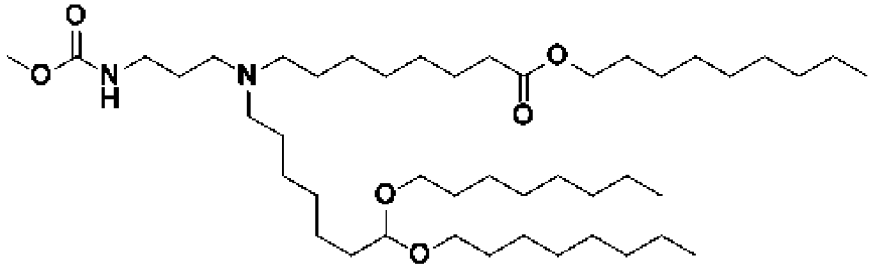
,



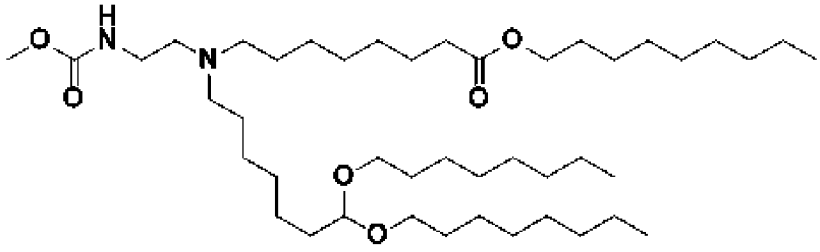
,



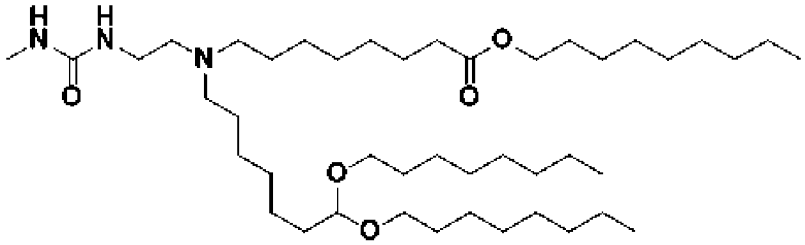
,



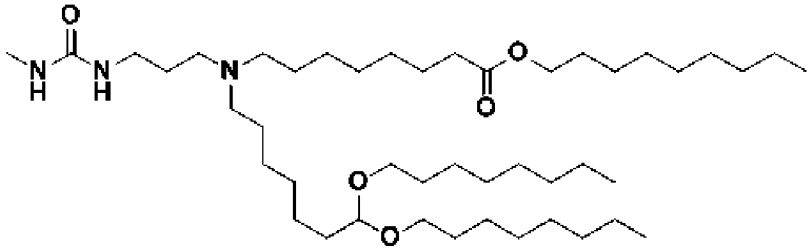
,



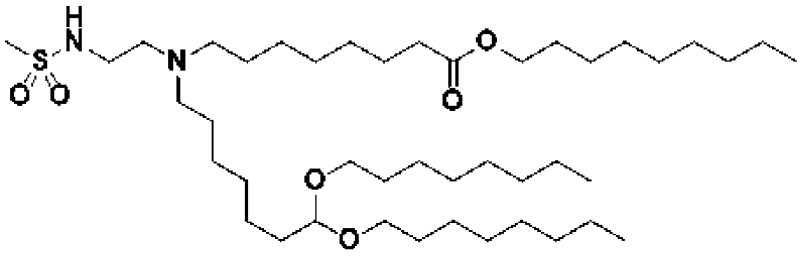
,

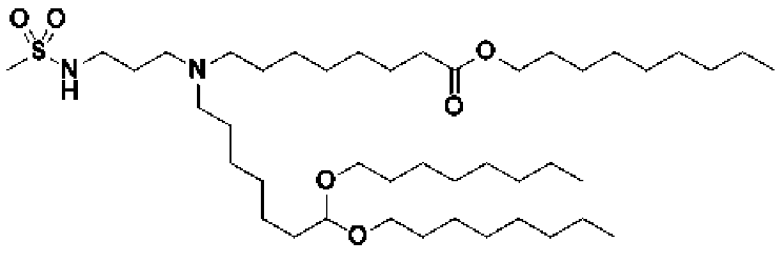


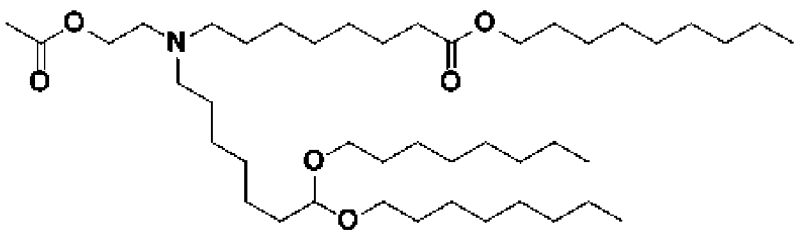
,

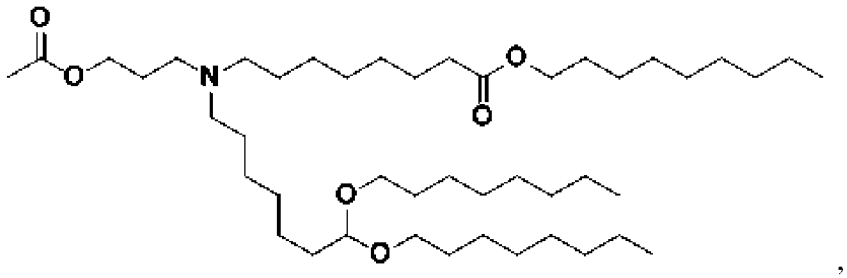


,


,


,


, и


,

или его соль.

55. Соединение по п. 55, в котором соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

56. Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором pKa протонированной формы соединения составляет от около 5,1 до около 8,0.

57. Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором pKa протонированной формы соединения составляет от около 5,7 до около 6,4.

58. Соединение по любому из предыдущих пунктов, в котором pKa протонированной формы соединения составляет от около 5,8 до около 6,2.

59. Соединение по любому из пп. 1-56, в котором pKa протонированной формы соединения составляет от около 5,5 до около 6,0.

60. Соединение по п. 59, в котором pKa протонированной формы соединения составляет от около 6,1 до около 6,3.

61. Композиция, содержащая соединение по любому из предыдущих пунктов и липидный компонент.

62. Композиция по п. 61, в которой композиция содержит около 50% соединения по любому из предыдущих пунктов и липидный компонент.

63. Композиция по п. 61 или 62, в которой композиция представляет собой композицию LNP.

64. Композиция по любому из пп. 61-63, в которой липидный компонент содержит хелперный липид и ПЭГ-липид.

65. Композиция по любому из пп. 61-64, в которой липидный компонент содержит хелперный липид, ПЭГ-липид и нейтральный липид.

66. Композиция по любому из пп. 61-65, дополнительно содержащая криопротектор.

67. Композиция по любому из пп. 61-66, дополнительно содержащая буфер.

68. Композиция по любому из пп. 61-67, дополнительно содержащая компонент нуклеиновой кислоты.

69. Композиция по п. 68, в которой компонент нуклеиновой кислоты представляет собой РНК- или ДНК-компонент.

70. Композиция по п. 68 или 69, в которой композиция имеет соотношение N/P около 3-10.

71. Композиция по п. 70, в которой соотношение N/P составляет около 6 ± 1.

72. Композиция по п. 70, в которой соотношение N/P составляет около 6 ± 0,5.

73. Композиция по п. 70, в которой соотношение N/P составляет около 6.

74. Композиция по любому из пп. 61-73, содержащая РНК-компонент, в которой РНК-компонент содержит мРНК.

75. Композиция по п. 74, в которой РНК-компонент содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как мРНК Cas-нуклеазы.

76. Композиция по п. 74 или 75, в которой РНК-компонент содержит мРНК Cas-нуклеазы класса 2.

77. Композиция по любому из пп. 74-76, в которой РНК-компонент содержит мРНК нуклеазы Cas9.

78. Композиция по любому из пп. 74-77, в которой мРНК представляет собой модифицированную мРНК.

79. Композиция по любому из пп. 74-78, в которой РНК-компонент содержит нуклеиновую кислоту гРНК.

80. Композиция по п. 79, в которой нуклеиновая кислота гРНК представляет собой гРНК.

81. Композиция по любому из пп. 74-78, в которой РНК-компонент содержит мРНК нуклеазы Cas класса 2 и гРНК.

82. Композиция по любому из пп. 79-81, в которой нуклеиновая кислота гРНК представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (дгРНК).

83. Композиция по любому из пп. 79-81, в которой нуклеиновая кислота гРНК представляет собой или кодирует одиночную гидовую РНК (огРНК).

84. Композиция по любому из пп. 79-83, в которой гРНК представляет собой модифицированную гРНК.

85. Композиция по п. 84, в которой модифицированная гРНК содержит модификацию на одном или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце.

86. Композиция по п. 84 или 85, в которой модифицированная гРНК содержит модификацию на одном или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце.

87. Композиция по любому из пп. 61-86, дополнительно содержащая по меньшей мере одну матричную нуклеиновую кислоту.

88. Способ редактирования генов, включающий в себя приведение в контакт клетки с композицией по любому из пп. 61-87.

89.Способ расщепления ДНК, включающий в себя приведение в контакт клетки с композицией по любому из пп. 61-87.

90.Способ по п. 89, в котором стадия приведения в контакт приводит к разрыву одноцепочечной ДНК.

91.Способ по п. 89, в котором стадия приведения в контакт приводит к разрыву двухцепочечной ДНК.

92. Способ по п. 88, в котором композиция содержит мРНК Cas класса 2 и нуклеиновую кислоту гидовой РНК.

93. Способ по п. 88 или 92, дополнительно включающий в себя введение по меньшей мере одной матричной нуклеиновой кислоты в клетку.

94. Способ по п. 93, включающий в себя приведение в контакт клетки с композицией, содержащей матричную нуклеиновую кислоту.

95.Способ по любому из пп. 88-94, в котором способ включает в себя введение композиции животному.

96.Способ по любому из пп. 88-95, в котором способ включает в себя введение композиции человеку.

97.Способ по любому из пп. 88-94, в котором способ включает в себя введение композиции в клетку.

98.Способ по п. 97, в котором клетка представляет собой эукариотическую клетку.

99. Способ по п. 88, в котором способ включает в себя введение мРНК в составе первой композиции LNP и второй композиции LNP, содержащей одну или более из мРНК, гРНК, нуклеиновой кислоты гРНК и матричной нуклеиновой кислоты.

100. Способ по п. 99, в котором первую и вторую композиции LNP вводят одновременно.

101. Способ по п. 99, в котором первую и вторую композиции LNP вводят последовательно.

102. Способ по п. 99, в котором способ включает в себя введение мРНК и нуклеиновой кислоты гидовой РНК в составе одной композиции LNP.

103. Способ по любому из пп. 88-102, в котором редактирование генов приводит к нокауту гена.

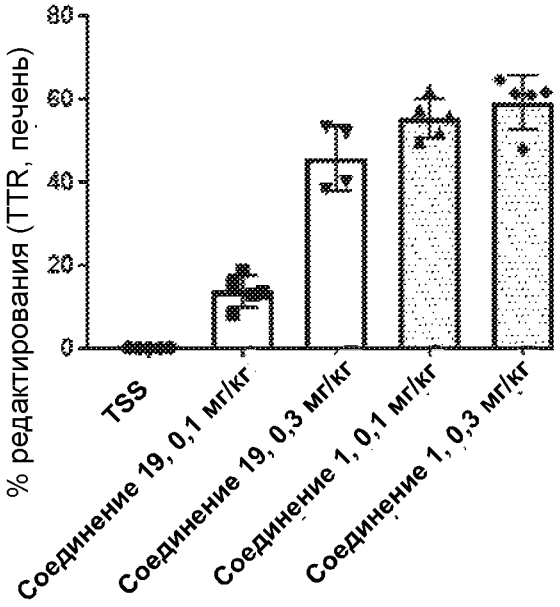
104. Способ по любому из пп. 88-102, в котором редактирование генов приводит к коррекции гена.

По доверенности

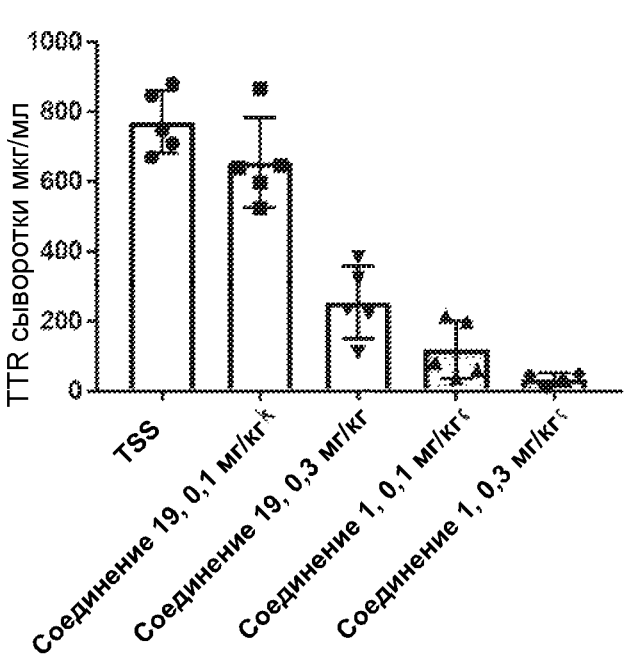
Фиг. 1

Редактирование B2M печени мыши
Редактирование (%)
50
40
30
20
10
0
TSS
Соединение 19
Соединение 1
Соединение 2
Соединение 3
Соединение 5
Соединение 6

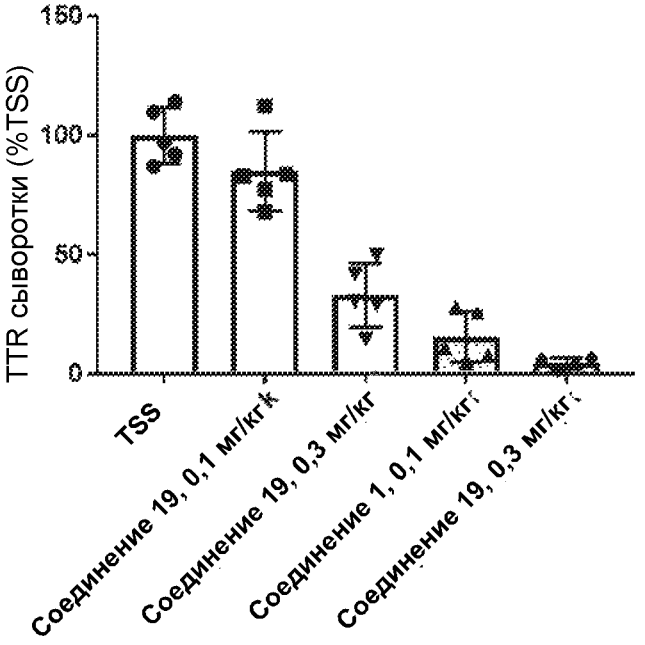
Фиг. 2A



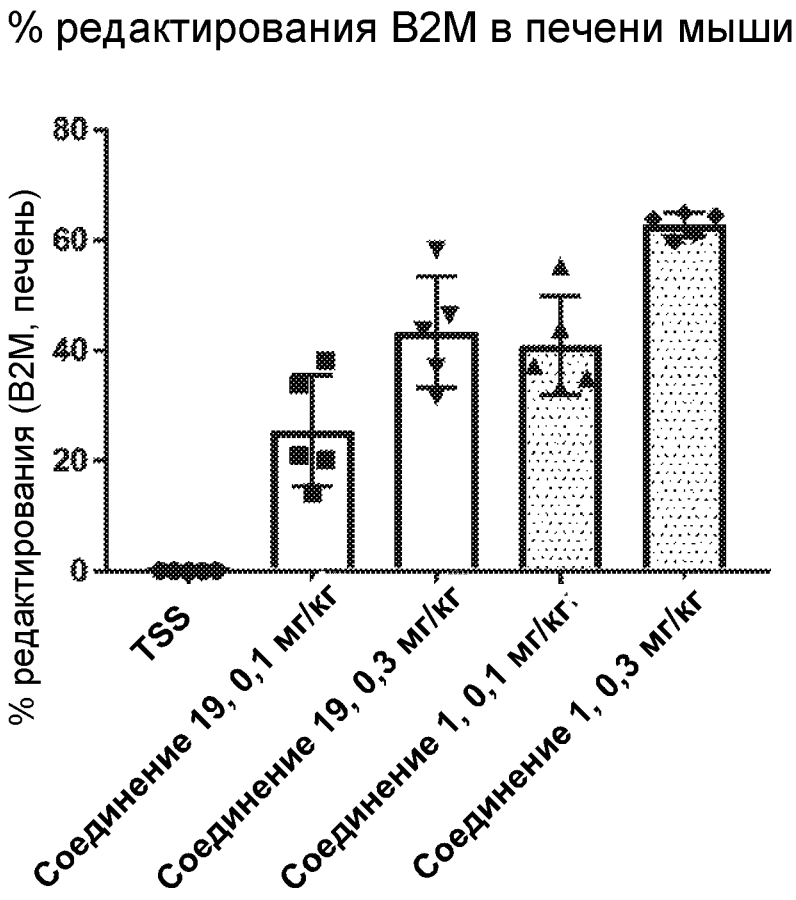
Фиг. 2B



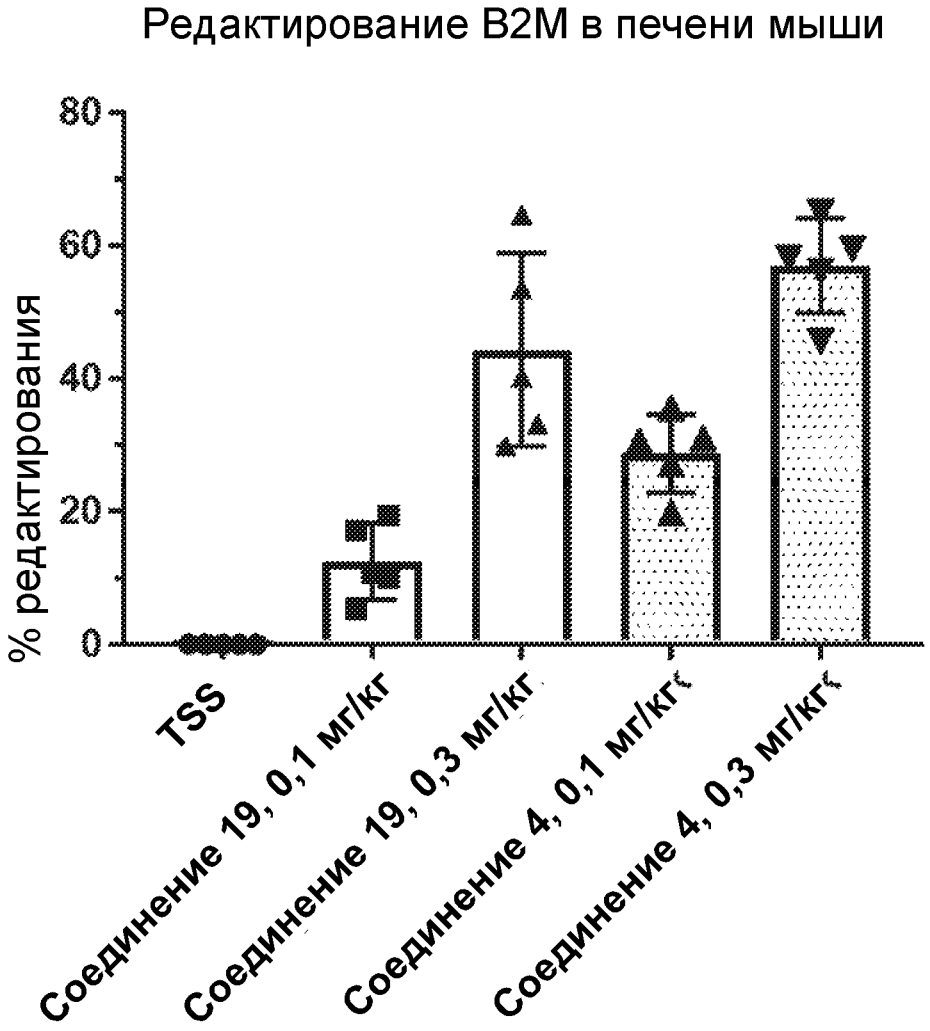
Фиг. 2C



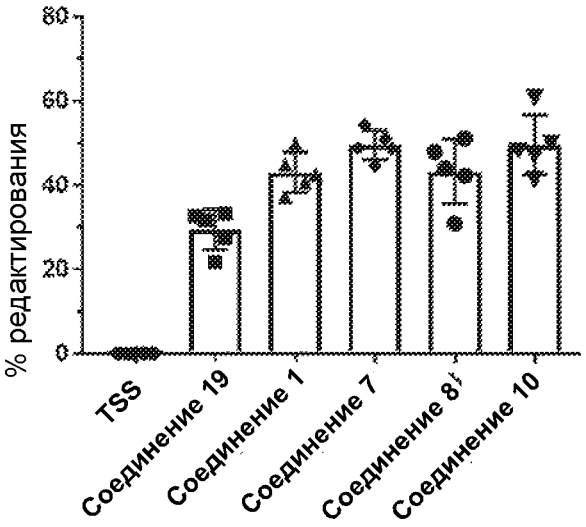
Фиг. 3


% редактирования B2M в печени мыши
% редактирования (B2M, печень)
80
60
40
20
0
TSS
Соединение 19, 0,1 мг/кг
Соединение 19, 0,3 мг/кг
Соединение 1, 0,1 мг/кг.
Соединение 1, 0,3 мг/кг

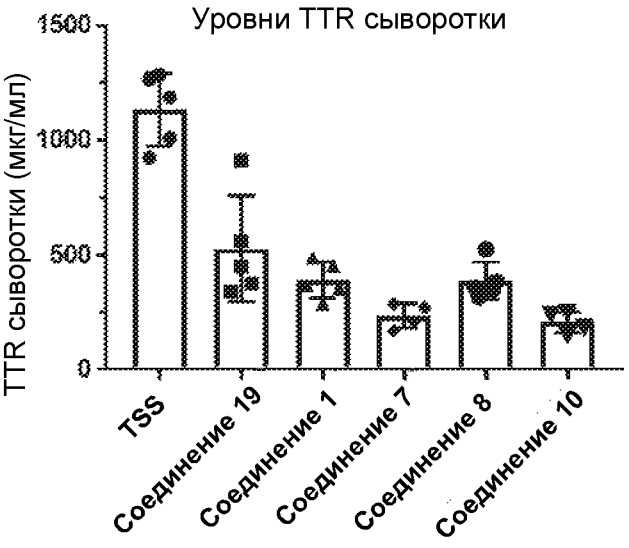
Фиг. 4


Редактирование B2M в печени мыши
% редактирования
80
60
40
20
0
TSS
Соединение 19, 0,1 мг/кг
Соединение 19, 0,3 мг/кг
Соединение 4, 0,1 мг/кг
Соединение 4, 0,3 мг/кг

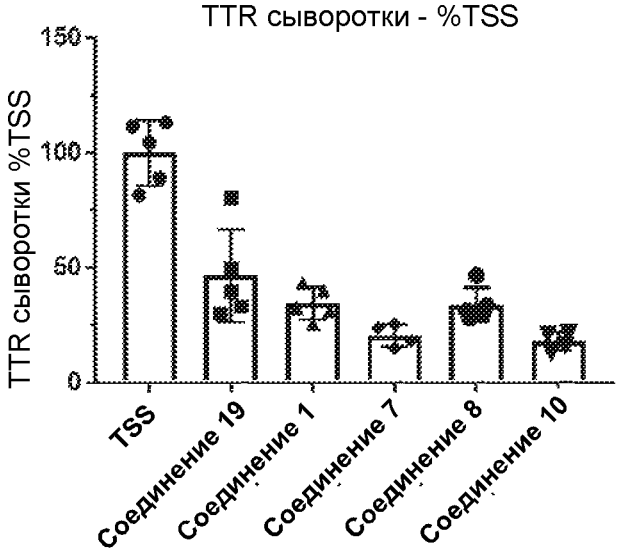
Фиг. 5A



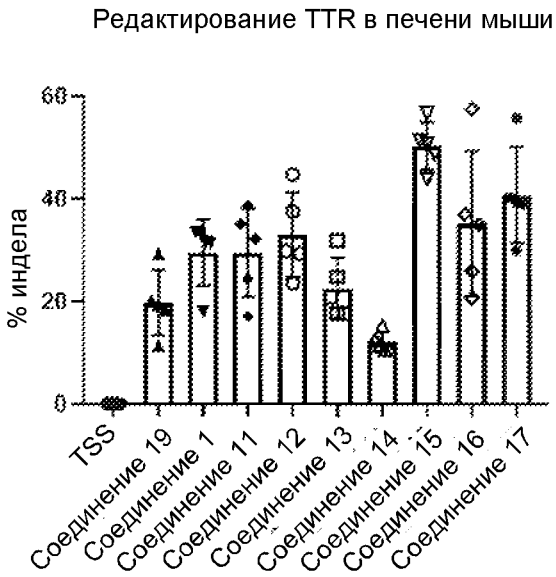
Фиг. 5B



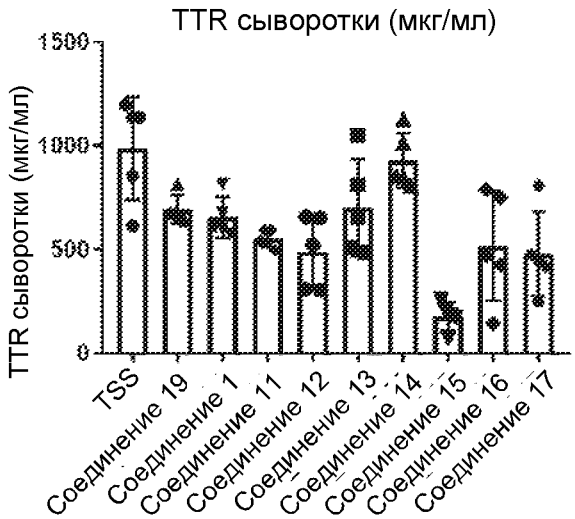
Фиг. 5C



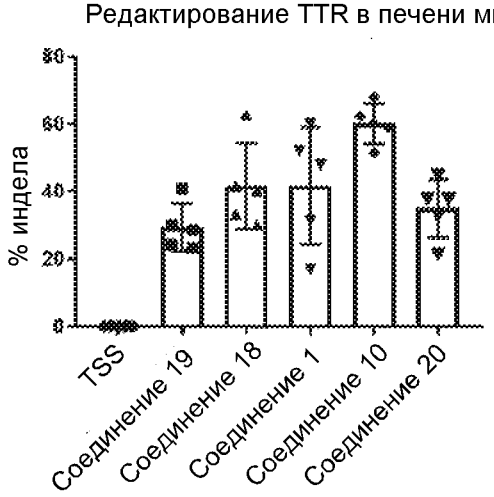
Фиг. 6A


Редактирование TTR в печени мыши
% индела
60
40
20
0
TSS
Соединение 19
Соединение 1
Соединение 11
Соединение 12
Соединение 13
Соединение 14
Соединение 15
Соединение 16
Соединение 17

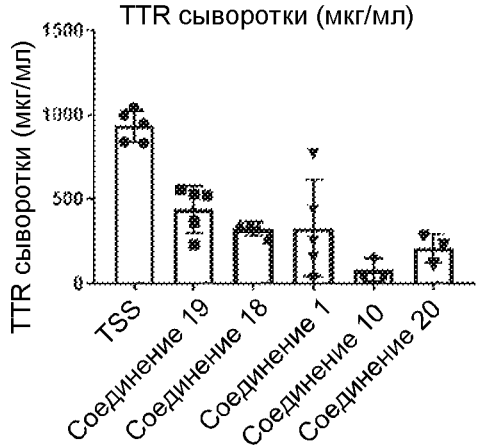
Фиг. 6B


TTR сыворотки (мкг/мл)
TTR сыворотки (мкг/мл)
1500
1000
500
0
TSS
Соединение 19
Соединение 1
Соединение 11
Соединение 12
Соединение 13
Соединение 14
Соединение 15
Соединение 16
Соединение 17

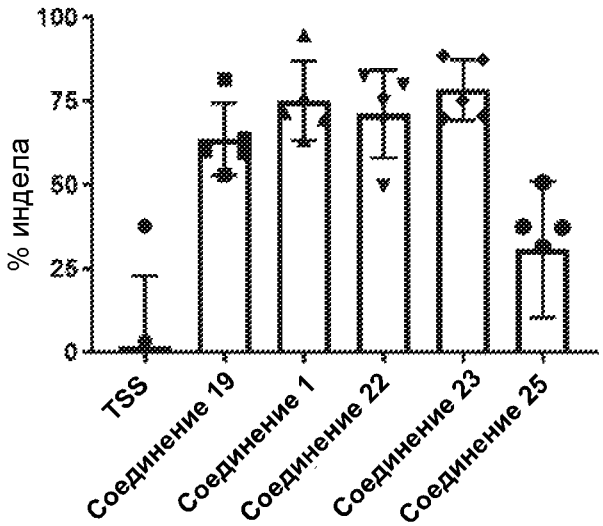
Фиг. 7A


Редактирование TTR в печени мыши
% индела
0
20
40
60
80
TSS
Соединение 19
Соединение 18
Соединение 1
Соединение 10
Соединение 20

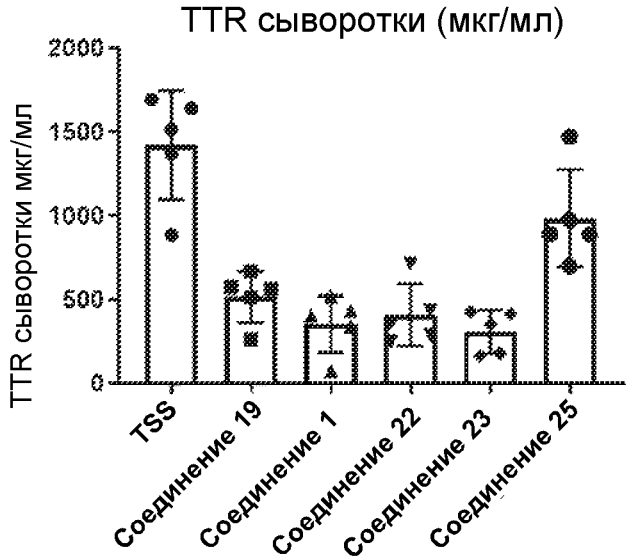
Фиг. 7B


TTR сыворотки (мкг/мл)
TTR сыворотки (мкг/мл)
0
500
1000
1500
TSS
Соединение 19
Соединение 18
Соединение 1
Соединение 10
Соединение 20

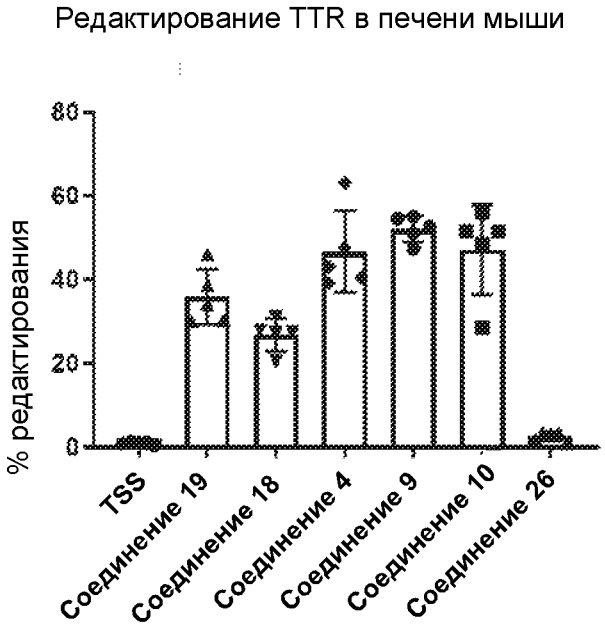
Фиг. 8A


Редактирование TTR в печени мыши
% индела
100
75
50
25
0
TSS
Соединение 19
Соединение 1
Соединение 22
Соединение 23
Соединение 25

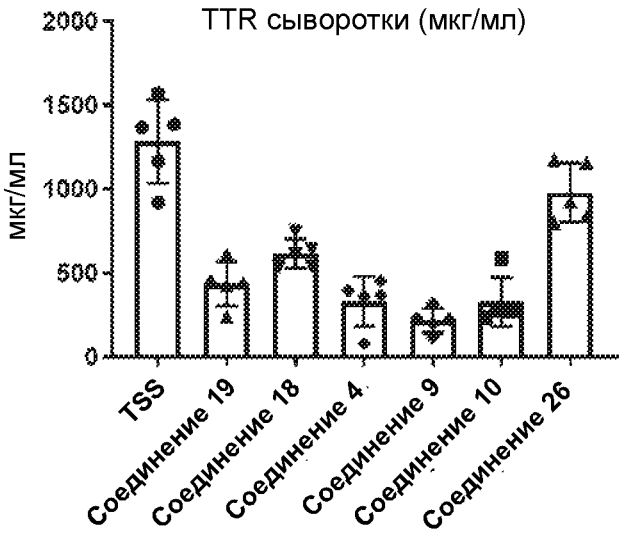
Фиг. 8B


TTR сыворотки (мкг/мл)
TTR сыворотки мкг/мл
2000
1500
1000
500
0
TSS
Соединение 19
Соединение 1
Соединение 22
Соединение 23
Соединение 25

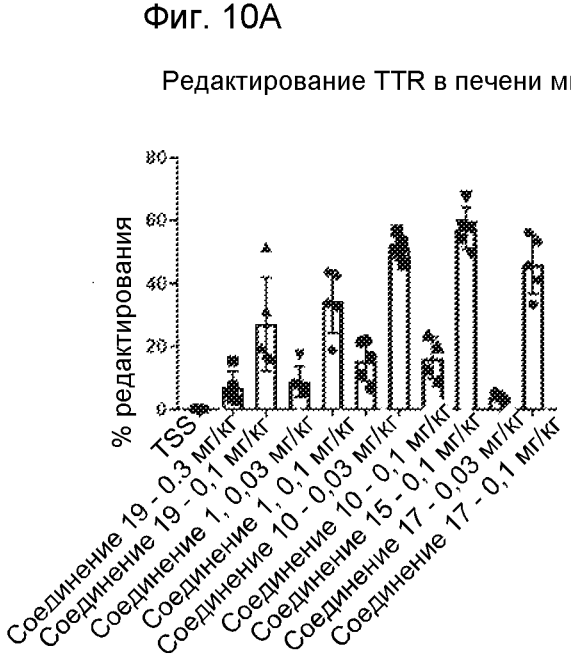
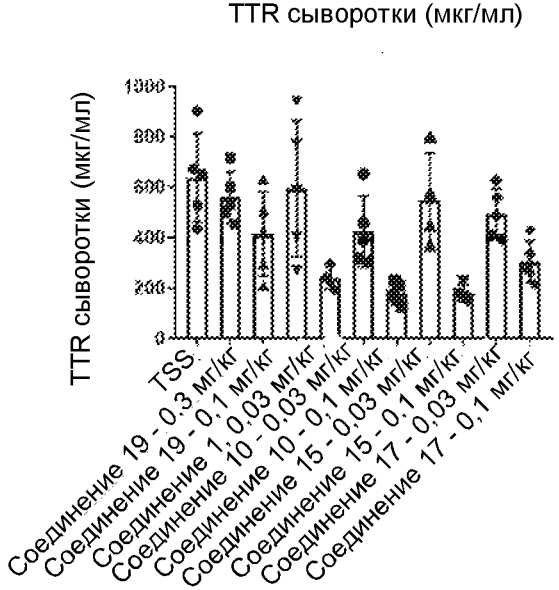
ФИГ. 9А


Редактирование TTR в печени мыши
% редактирования
80
60
40
20
0
TSS
Соединение 19
Соединение 18
Соединение 4
Соединение 9
Соединение 10
Соединение 26

ФИГ. 9В


TTR сыворотки (мкг/мл)
мкг/мл
2000
1500
1000
500
0
TSS
Соединение 19
Соединение 18
Соединение 4
Соединение 9
Соединение 10
Соединение 26

Фиг. 10A



Фиг. 10B