

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046334

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.01

(21) Номер заявки
202092577

(22) Дата подачи заявки
2019.04.29

(51) Int. Cl. C08G 69/10 (2006.01)
C08G 69/40 (2006.01)
C08G 69/48 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(54) КАТИОННЫЙ ПОЛИМЕР И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ БИМОЛЕКУЛ

(31) 62/663,985; 62/750,097

(32) 2018.04.27; 2018.10.24

(33) US

(43) 2021.03.16

(86) PCT/US2019/029746

(87) WO 2019/210326 2019.10.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕНЕДИТ ИНК. (US)

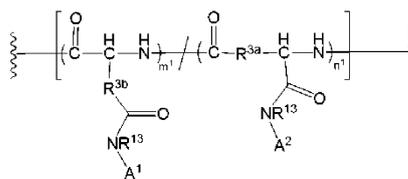
(72) Изобретатель:
Ли Кунвоо, Майги Сантану (US)

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

(56) US-A1-2012053295

KIM H.J. ET AL.: "Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 145, no. 2, 14 July 2010 (2010-07-14), pages 141-148, XP027102425, ISSN: 0168-3659 [retrieved on 2010-06-23], abstract

(57) Изобретение относится к полимеру, композиции, включающей полимер, и способу для доставки терапевтических молекул. Предложен полимер, содержащий структуру формулы 4:



Также предложены композиция для доставки нуклеиновой кислоты и/или полипептида в клетку, содержащая указанный полимер и нуклеиновую кислоту и/или полипептид, и способ доставки нуклеиновой кислоты и/или полипептида в клетку, включающий введение в клетку данной композиции. Изобретение обеспечивает безопасную и эффективную доставку больших молекул, таких как полипептиды и нуклеиновые кислоты, в целевые ткани.

B1

046334

046334

B1

Материалы, представленные в электронном виде, включенные в виде ссылки

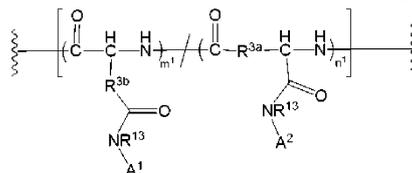
В настоящее описание включен машиночитаемый список нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, во всей своей полноте в виде ссылки, представленный одновременно с настоящим документом в виде одного 62527-байтового файла в ASCII (текстовом) формате, названного "512879.TXT", который создан 29 апреля 2019 г.

Уровень техники

Технологии на основе пептидов, белков и нуклеиновых кислот находят многочисленное применение для профилактики, лечения и терапии заболеваний. Однако безопасная и эффективная доставка больших молекул (например, полипептидов и нуклеиновых кислот) в целевые ткани остается проблематичной. Соответственно, по-прежнему существует потребность в новых композициях и способах, полезных для доставки терапевтических молекул.

Сущность изобретения

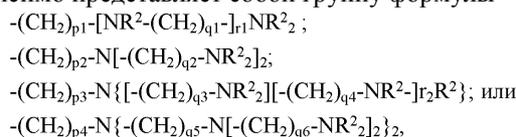
Настоящее изобретение относится к полимеру, содержащему структуру формулы 4:



где каждый из m^1 и n^1 представляет собой целое число от 0 до 1000 при условии, что сумма m^1+n^1 больше чем 2;

символ "/" указывает, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в любом порядке;

каждый из A^1 и A^2 независимо представляет собой группу формулы



где каждый из $p1-p4$, $q1-q6$ и $r1$ и $r2$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1-C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу при условии, что каждый из A^1 и A^2 содержит по меньшей мере один третичный амин;

каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

каждый R^{13} независимо представляет собой водород или C_1-C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу.

Также представлена композиция для доставки нуклеиновой кислоты и/или полипептида в клетку, содержащая структуру формулы 4 и нуклеиновую кислоту и/или полипептид.

Также представлен способ доставки нуклеиновой кислоты и/или полипептида в клетку, включающий введение в клетку данной композиции.

Краткое описание рисунков

На фиг. 1 представлена аминокислотная последовательность Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SEQ ID NO: 1).

На фиг. 2 представлена аминокислотная последовательность Cpf1 из *Francisella tularensis* subsp. *Novicida* U112 (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 3 представлен график уровня доставки Cas9 RNP, измеренного по процентному содержанию отрицательно заряженного зеленого флуоресцентного белка ("GFP") в клетках GFP-НЕК при различных дозах композиций полимер/Cas9.

На фиг. 4 представлена схематическая иллюстрация репортерного аллеля ai9.

На фиг. 5 показан уровень доставки Cre-рекомбиназы в первичные миобласты, измеренный по величине экспрессии RFP+ при различных концентрациях композиций полимер/Cre

На фиг. 6 показан уровень доставки Cre-рекомбиназы в мышцу мыши, визуализированной с помощью красного флуоресцентного белка (более светлые участки указывают на флуоресценцию).

На фиг. 7 показана частота индел-мутаций в нейрональных стволовых клетках человека, определенная по величине доставки Cas9.

На фиг. 8 схематично показана генетическая конструкция "Traffic light reporter" в НЕК 293Т.

На фиг. 9 показан уровень доставки Cre-рекомбиназы в TLR-НЕК 293Т, измеренный по уровню экспрессии RFP+ при различных концентрациях композиций полимер/Cre.

На фиг. 10 представлен график уровня доставки РНП (RNP) Cas9, измеренный по % содержанию зеленого флуоресцентного белка ("GFP") в клетках GFP-НЕК при различных дозах композиций полимер/Cas9.

На фиг. 11 показан уровень доставки мРНК eGFP в клетки НЕК 293Т, измеренный по % содержа-

нию GFP.

На фиг. 12 показана зависимость от времени инкубации уровня доставки мРНК eGFP в клетки НЕК 293Т, измеренная по % содержанию GFP.

На фиг. 13 показан уровень доставки мРНК красного флуоресцентного белка ("RFP") в клетки НЕК 293Т, измеренный по уровню экспрессии RFP+ как в присутствии, так и в отсутствие полимера PEG-PAsp (DET) размером 1,5 кДа.

На фиг. 14 показан уровень мРНК красного флуоресцентного белка ("RFP") в клетках НЕК 293Т, измеренный по уровню экспрессии RFP+ как в присутствии, так и в отсутствие полимера PEG-PAsp (DET) размером 1,5 кДа.

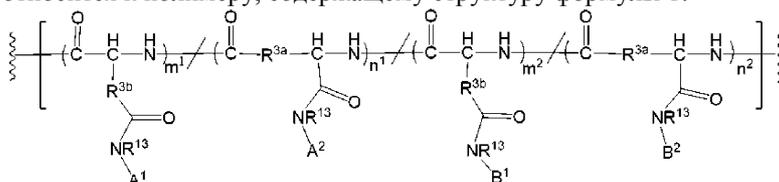
На фиг. 15 представлен график уровня доставки РНП Cas9, измеренного по % содержанию зеленого флуоресцентного белка ("GFP") в клетках GFP-НЕК для наночастиц полимер/Cas9 в буфере.

На фиг. 16 представлена последовательность AsCpf1 (SEQ ID NO: 19).

На фиг. 17 представлена последовательность LbCpf1 (SEQ ID NO: 20).

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к полимеру, содержащему структуру формулы 1:



где каждый из m^1 и n^1 представляет собой целое число от 0 до 1000;

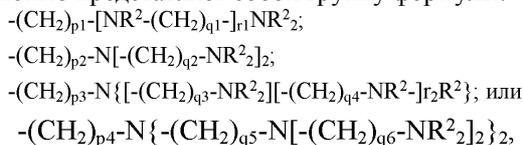
каждый из m^2 и n^2 представляет собой целое число от 0 до 1000 при условии, что сумма m^2+n^2 больше чем 5;

символ "/" указывает на то, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в любом порядке;

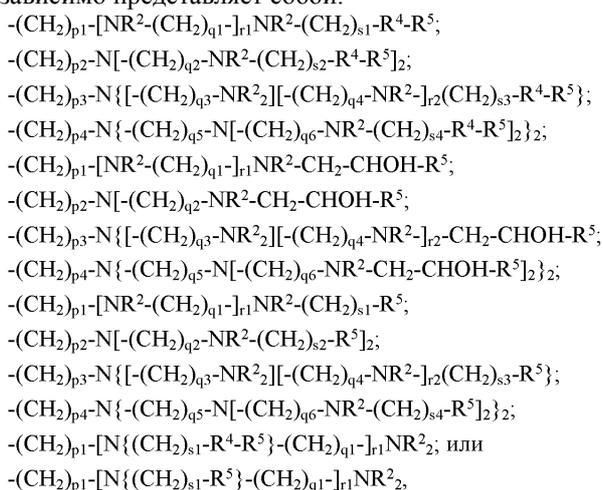
каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

каждый R^{13} независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый из A^1 и A^2 независимо представляет собой группу формулы:



каждый из B^1 и B^2 независимо представляет собой:



где каждый из $p1$ - $p4$, $q1$ - $q6$, $r1$ и $r2$, и $s1$ - $s4$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый R^4 независимо представляет собой $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, или $-S(O)(O)-$;

каждый R^5 независимо представляет собой замещенную или незамещенную алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 или от 2 до 8 вторичных или третичных аминов, или заместитель, содержащий тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент.

В контексте настоящего описания "алкил" относится к замещенной или незамещенной

углеводородной цепи. Алкильная группа может иметь любое количество атомов углерода (например, C₁-C₁₀₀-алкил, C₁-C₅₀-алкил, C₁-C₁₂-алкил, C₁-C₈-алкил, C₁-C₆-алкил, C₁-C₄-алкил, C₁-C₂-алкил и т.д.). Углеводородная цепь может быть замещенной или в некоторых вариантах осуществления может быть незамещенной до любой степени (например, в случае алкенильных или алкинильных групп) и может быть линейной, разветвленной, с прямой цепью, циклической (например, циклоалкил или циклоалкенил) или их комбинацией. Циклические группы могут быть моноциклическими, слитыми с образованием бициклических или трициклических групп, связанных связью, или спироциклическими. Циклические группы содержат по меньшей мере три углерода (например, C₃-C₁₂, C₃-C₁₀, C₃-C₈, C₃-C₆ или C₅-C₆). В некоторых вариантах осуществления углеводородная цепь может быть прервана одним или более гетероатомами (например, 1, 2, 3, 4 или 5 или более атомами кислорода, азота и/или серы), обеспечивая таким образом гетероалкил, гетероалкенил, гетероалкинил или гетероциклил (т.е. гетероциклическую группу). В некоторых вариантах осуществления алкил, алкенил, алкинил замещен одним или более заместителями.

Термин "гетероциклил" или "гетероциклическая группа" относится к циклической группе, например ароматической (например, гетероарильной) или неароматической группе, где циклическая группа имеет один или более гетероатомов (например, 1, 2, 3, 4 или 5 или более атомов кислорода, азота и/или серы). В некоторых вариантах осуществления гетероциклил или гетероциклическая группа (т.е. циклическая группа, например ароматическая (например, гетероарильная) или неароматическая, где циклическая группа имеет один или более гетероатомов) является замещенной одним или более заместителями.

Термин "арил" относится к ароматической кольцевой системе, имеющей любое подходящее количество кольцевых атомов и любое подходящее количество колец. Арильные группы могут включать любое подходящее количество кольцевых атомов, например 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 кольцевых атомов, а также от 6 до 10, от 6 до 12 или от 6 до 14 членов кольца. Арильные группы могут быть моноциклическими, слитыми с образованием бициклических или трициклических групп или связанными связью с образованием биарильной группы. Представители арильных групп включают фенил, нафтил и бифенил. В некоторых вариантах осуществления арильная группа содержит алкиленовую связывающую группу, обеспечивающую образование арилалкильной группы (например, бензильной группы). Некоторые арильные группы имеют от 6 до 12 членов кольца, например фенил, нафтил или бифенил. Другие арильные группы имеют от 6 до 10 членов кольца, такие как фенил или нафтил. В некоторых вариантах осуществления арильный заместитель содержит один или более гетероатомов (например, 1, 2, 3, 4 или 5 или более атомов кислорода, азота и/или серы), таким образом обеспечивая гетероарильную группу. В некоторых вариантах осуществления арил является замещенным одним или более заместителями.

Понятно, что любая из вышеперечисленных групп может быть одновалентной, двухвалентной или поливалентной (например, алкилен, алкенилен, алкинилен, арилен, гетероалкилен, гетероалкенилен, гетероалкинилен, гетероциклилен, гетероарилен и т.п.).

В контексте настоящего описания термин "замещенный" может означать, что один или более атомов водорода на указанном атоме или группе (например, замещенной алкильной группе) замещен другой группой при условии, что нормальная валентность указанного атома не превышена. Например, когда заместитель представляет собой оксо (т.е. =O), то заменены два водорода на атоме. Группы заместителей могут включать одно или более из: альдегида, эфира, амида, кетона, нитро, циано, фторалкила (например, трифторметана), галогена (например, фтора), арила (например, фенила), гетероциклила или гетероциклической группы (т.е. циклической группы, например, ароматической (например, гетероарила) или неароматической, причем циклическая группа имеет один или более гетероатомов), оксо или их заместителей. Допускаются комбинации заместителей и/или переменных при условии, что заместители не оказывают существенного отрицательного воздействия на синтез или применение соединения.

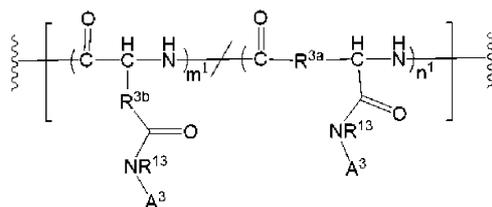
Согласно формуле 1, каждый из m¹ и n¹ представляет собой целое число от 0 до 1000, например 0-500, 0-200, 0-100 или 0-50. Более того, каждый из m² и n² представляет собой целое число от 0 до 1000, например 0-500 или 0-100, при условии, что сумма m²+n² больше чем 5 (например, 5-2000, 5-1000, 5-500, 5-200, 5-100 или 5-50). Другими словами, полимер содержит по меньшей мере некоторое количество мономерных звеньев, содержащих группы V¹ и/или V², которые в настоящем описании упоминаются под общим названием "мономеры V". В некоторых вариантах осуществления m¹ и n¹ равны нулю, т.е. такой полимер не содержит ни группу A¹, ни группу A². В других вариантах осуществления полимер содержит некоторое количество групп A¹ и/или A² и некоторое количество групп V¹ и/или V². В таких вариантах осуществления отношение (m¹+n¹)/(m²+n²) составляет примерно 20 или менее (например, примерно 10 или менее, примерно 5 или менее, примерно 2 или менее или даже примерно 1 или менее). Также в некоторых вариантах осуществления отношение (m¹+n¹)/(m²+n²) составляет примерно 0,2 или более, например примерно 0,5 или более.

Полимер может существовать в виде структуры любого подходящего типа. Например, полимер может существовать в виде полимера с регулярным чередованием мономерных звеньев, статистического полимера, блок-полимера, привитого полимера, линейного полимера, разветвленного полимера, циклического полимера или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой статистический полимер, блок-полимер, привитой полимер или их комбинацию.

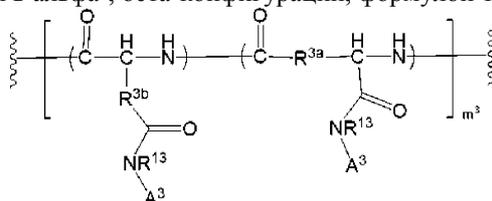
Таким образом, в структуре формулы 1 мономеры (которые могут быть обозначены соответствующим

щими им боковыми цепями A^1 , A^2 , B^1 и B^2) могут быть расположены случайным образом или в любом порядке. Целые числа m^1 , n^1 , m^2 и n^2 просто обозначают количество соответствующих мономеров, которые появляются в цепи в целом, и необязательно представляют блоки этих мономеров, хотя в некоторых вариантах осуществления могут присутствовать блоки или участки данного мономера. Например, структура формулы 1 может включать мономеры в порядке $-A^1-A^2-B^1-B^2-$, $-A^2-A^1-B^2-B^1-$, $-A^1-B^1-A^2-B^2-$ и т.д. В некоторых вариантах осуществления полимер имеет полипептидную (например, полиаспартамидную) основу, расположенную в альфа/бета-конфигурации, в которой мономеры "1" и "2" чередуются (например, $-A^1-A^2-B^1-B^2-$, $-A^2-A^1-B^2-B^1-$, $-A^1-B^2-B^1-A^2-$, $-A^2-B^1-B^2-A^1-$, $-B^1-A^2-B^1-A^2-$ и т.д.). Однако мономеры или боковые цепи "A" и "B" (например, A^1/A^2 и B^1/B^2) могут быть распределены случайным образом по всей основной цепи полимера или могут быть расположены в виде блоков или некоторой их комбинации.

В качестве дополнительной иллюстрации полимер можно было бы альтернативно описать формулой 1.1:



или, если остов находится в альфа-, бета-конфигурации, формулой 1.2:



где m^1 и n^1 являются такими, как описано выше;

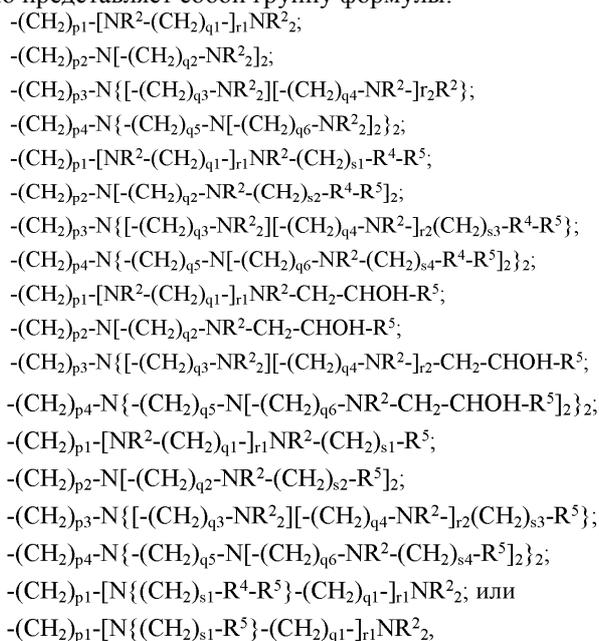
m^3 представляет собой целое число от 5-2000 (например, 5-1000, 5-500, 5-100, 25-2000, 25-500, 25-100, 50-2000, 50-1000, 50-500 или 50-100);

символ "/" указывает, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в любом порядке;

каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

каждый R^{13} независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый A^3 независимо представляет собой группу формулы:



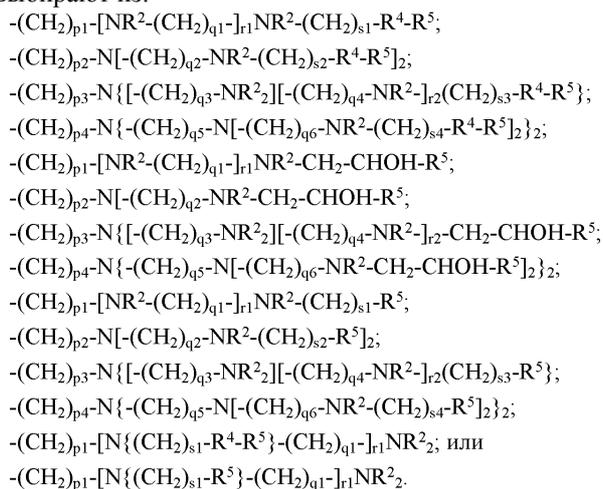
где каждый из $p1$ - $p4$, $q1$ - $q6$, $r1$ и $r2$ и $s1$ - $s4$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

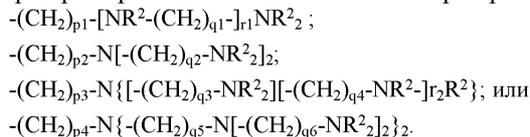
каждый R^4 независимо представляет собой $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$ или $-S(O)(O)-$;

каждый R^5 независимо представляет собой алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 или от 2 до 8 вторичных или третичных аминов, или заместитель, содержащий тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент;

при условии, что по меньшей мере примерно 5% (например, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или даже 100%) групп A^3 выбирают из:



В другом варианте осуществления полимер содержит некоторое количество или даже большую часть групп A^3 (по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95%), выбранных из:



В любой из указанных выше полимерных структур R^{3a} и R^{3b} независимо представляют собой метиленовую или этиленовую группу. В некоторых вариантах осуществления R^{3a} представляет собой этиленовую группу и R^{3b} представляет собой метиленовую группу или R^{3a} представляет собой метиленовую группу и R^{3b} представляет собой этиленовую группу. В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{3a} и R^{3b} представляет собой этиленовую группу. В предпочтительных вариантах осуществления каждый из R^{3a} и R^{3b} представляет собой метиленовую группу.

Группы A^1 и A^2 выбирают независимо, и, следовательно, они могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Аналогично, группы B^1 и B^2 выбирают независимо, и они могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Кроме того, присутствующие группы A^3 могут быть одинаковыми или каждая группа A^3 может отличаться от других групп A^3 .

В группах A^1 , A^2 , A^3 , B^1 и B^2 каждое из целых чисел $p1$ - $p4$ (т.е. $p1$, $p2$, $p3$ и $p4$), $q1$ - $q6$ (т.е. $q1$, $q2$, $q3$, $q4$, $q5$ и $q6$) и $r1$ и $r2$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5). В некоторых вариантах осуществления каждое из $p1$ - $p4$ (т.е. $p1$, $p2$, $p3$ и $p4$), $q1$ - $q6$ (т.е. $q1$, $q2$, $q3$, $q4$, $q5$ и $q6$) и/или $r1$ и $r2$ независимо представляет собой целое число от 1 до 3 (например, 1, 2 или 3). В некоторых вариантах осуществления каждое из $p1$ - $p4$ (т.е. $p1$, $p2$, $p3$ и $p4$) и/или $q1$ - $q6$ (т.е. $q1$, $q2$, $q3$, $q4$, $q5$ и $q6$) равно 2. В некоторых вариантах осуществления каждое из $p1$ - $p4$ (т.е. $p1$, $p2$, $p3$ и $p4$) и/или $q1$ - $q6$ (т.е. $q1$, $q2$, $q3$, $q4$, $q5$ и $q6$) равно 2, и каждое из $r1$ и $r2$ равно 1. В некоторых вариантах осуществления каждое из $s1$ - $s4$ независимо представляет собой целое число от 1, 2, 3, 4 или 5, например, 1, 2 или 3, или 1-2.

В полимерной структуре каждый R^4 независимо представляет собой $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$ или $-S(O)(O)-$. В некоторых вариантах осуществления каждый R^4 независимо представляет собой $-C(O)O-$ или $-C(O)NH-$. В некоторых вариантах осуществления каждый R^4 представляет собой $-C(O)O-$. В некоторых вариантах осуществления каждый R^4 представляет собой $-C(O)NH-$.

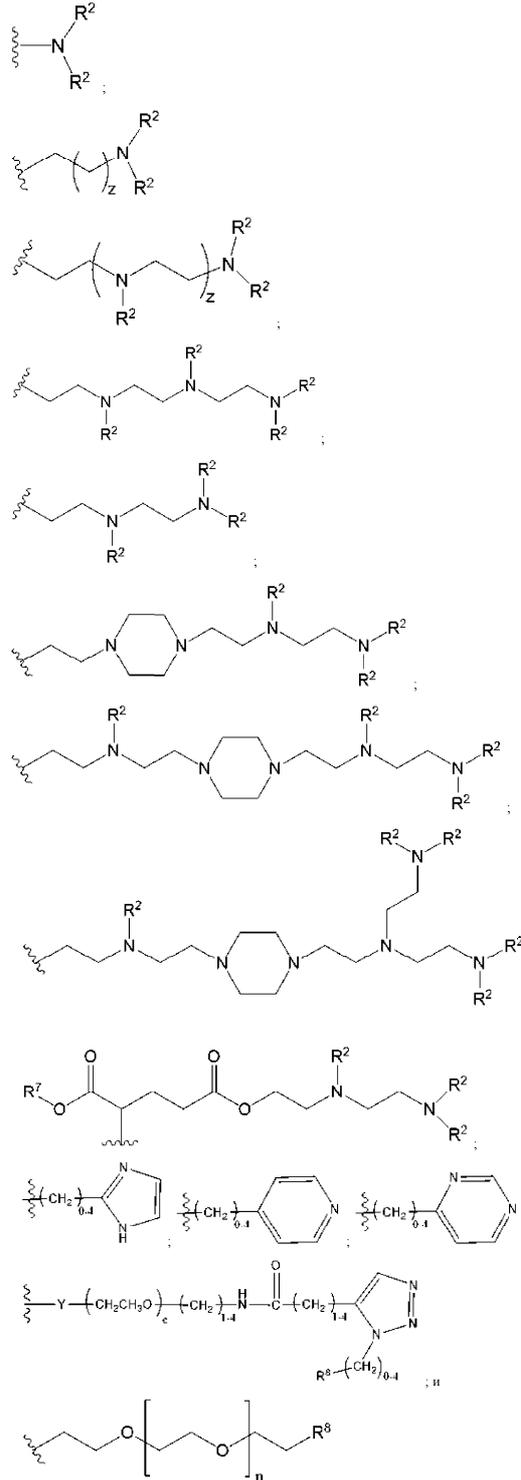
В некоторых вариантах осуществления формулы 1 каждый из A^1 и A^2 представляет собой группу формулы $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH_2$, такую как группа $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$. Дополнительно или альтернативно, каждый из B^1 и B^2 представляет собой группу формулы $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$, такую как группа $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$, или группу $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-C(O)-O-R^5$. В некоторых вариантах осуществления каждый из B^1 и B^2 представляет собой группу формулы $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$ или $-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-R^5$, при этом необязательно каждый из R^2 независимо представляет собой C_1 - C_3 -алкил (например, метил), и причем необязательно R^5 представляет собой C_1 - C_3 -алкиламино или C_1 - C_3 -диалкиламино (например, R^5 представляет собой $-CH_2-NH-CH_3$ или $-CH_2-N-(CH_3)_2$).

В некоторых вариантах осуществления формулы 1.1 A^3 представляет собой группу формулы $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH_2$, такую как группа $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH_2$; или группу формулы $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$, такую как группа $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$; $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-C(O)-O-R^5$; или группу $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$, такую как $-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-R^5$, при этом необязательно каждый из R^2 независимо представляет собой C_1 - C_3 -алкил (например, метил), и при этом необязательно R^5 представляет собой C_1 - C_3 -алкиламино или C_1 - C_3 -диалкиламино (например, R^5 представляет собой $-CH_2-NH-CH_3$ или $-CH_2-N-(CH_3)_2$); при условии, что по меньшей мере примерно 5% (например, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или даже 100%) групп A^3 представляют собой $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}[S]H-(CH_2)_2-R^4-R^5$, такую как группа $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$ или группа $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-C(O)-O-R^5$; или группу $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$, такую как $-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-R^5$, при этом необязательно каждый из R^2 независимо представляет собой C_1 - C_3 -алкил (например, метил), и при этом необязательно R^5 представляет собой C_1 - C_3 -алкиламино или C_1 - C_3 -диалкиламино (например, R^5 представляет собой $-CH_2-NH-CH_3$ или $-CH_2-N-(CH_3)_2$).

Дополнительно, в некоторых вариантах осуществления полимер имеет некоторое количество или даже большую часть групп A^3 (по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95%), которые представляют собой $-(CH_2)_{p1}-[NH-(CH_2)_{q1}]_{r1}NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$, такую как группа $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-R^4-R^5$ или группа $-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-C(O)-O-R^5$; или группу $-(CH_2)_{p1}-[NR^2-(CH_2)_{q1}]_{r1}NR^2-(CH_2)_{s1}-R^5$, такую как $-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-NR^2-(CH_2)_2-R^5$, при этом необязательно каждый из R^2 независимо представляет собой C_1 - C_3 -алкил (например, метил), и при этом необязательно R^5 представляет собой C_1 - C_3 -алкиламино или C_1 - C_3 -диалкиламино (например, R^5 представляет собой $-CH_2-NH-CH_3$ или $-CH_2-N-(CH_3)_2$).

Более того, в полимерных структурах каждый из R^5 независимо представляет собой алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 (или от 2 до 8) вторичных или третичных аминов. Любая из вышеуказанных групп R^5 может быть замещенной или незамещенной. R^5 также может быть заместителем, содержащим тканеспецифический или клеточеспецифический нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R^5 может содержать от примерно 1 до примерно 50 атомов углерода (например, от примерно 2 до примерно 50 атомов углерода, например от примерно 2 до примерно 40 атомов углерода, от примерно 2 до примерно 30 атомов углерода, от примерно 2 до примерно 20 атомов углерода, от примерно 1 до примерно 16 или от примерно 2 до примерно 16 атомов углерода, от примерно 1 до примерно 12 или от примерно 2 до примерно 12 атомов углерода, от примерно 1 до примерно 10 или от примерно 2 до примерно 10 атомов углерода или от примерно 1 до примерно 8 или от примерно 2 до примерно 8 атомов углерода). В некоторых вариантах осуществления R^5 представляет собой гетероалкильную группу, содержащую от 1 до 8 (или от 2 до 8) (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) вторичных или третичных аминов. Вторичные или третичные амины могут представлять собой часть гетероалкильного остова (т.е. самой длинной непрерывной цепи атомов в гетероалкильной группе) или боковой (повешенный) заместитель. Таким образом, например, гетероалкильная группа, содержащая вторичные или третичные амины, может быть алкиламино группой, диалкиламино группой, аминоалкильной группой, алкиламиноалкильной группой, диалкиламиноалкильной группой, аминоалкиламино группой или т.п., содержащей от 1 до 8 (или 2-8) вторичных или третичных аминов.

В некоторых вариантах осуществления каждый из R^5 независимо выбирают из:



где каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

R^7 представляет собой C_1 - C_{50} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, необязательно замещенную одним или более аминами;

z представляет собой целое число от 1 до 5;

s представляет собой целое число от 0 до 50;

Y необязательно присутствует и является расщепляемым линкером;

n представляет собой целое число от 0 до 50;

R^8 представляет собой тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент, C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу.

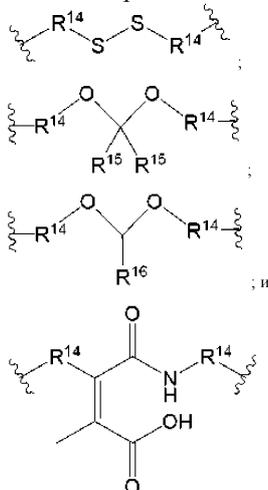
Каждый R^2 может представлять собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу. В некоторых вариантах осуществления R^2 пред-

ставляет собой линейную или разветвленную C_1 - C_{12} -алкильную группу (например, C_1 - C_{10} -алкильную группу; C_1 - C_8 -алкильную группу; C_1 - C_6 -алкильную группу; C_1 - C_4 -алкильную группу, C_1 - C_3 -алкильную группу или C_1 или C_2 алкильную группу). В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой метил или водород.

R^7 может представлять собой C_1 - C_{50} (например, C_1 - C_{40} , C_1 - C_{30} , C_1 - C_{20} , C_1 - C_{10} , C_4 - C_{12} или C_6 - C_8) алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, необязательно замещенную одним или более аминами. В некоторых вариантах осуществления R^7 представляет собой C_4 - C_{12} , например C_6 - C_8 , алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, необязательно замещенную одним или более аминами. В некоторых вариантах осуществления R^7 является замещенным одним или более аминами. В некоторых вариантах осуществления R^7 является замещенным 1-8 или 2-8 (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) вторичными или третичными аминами. Амины могут быть частью алкильной группы (т.е. включенной в остов, состоящий из алкильной группы) или боковым (повешенным) заместителем.

R^{13} может представлять собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу. В некоторых вариантах осуществления R^{13} представляет собой линейную или разветвленную C_1 - C_{12} -алкильную группу (например, C_1 - C_{10} -алкильную группу; C_1 - C_8 -алкильную группу; C_1 - C_6 -алкильную группу; C_1 - C_4 -алкильную группу, C_1 - C_3 -алкильную группу или C_1 или C_2 алкильную группу). В некоторых вариантах осуществления R^{13} является метилом. В других вариантах осуществления R^{13} может представлять собой водород. Обычно, в заданном полимере все R^{13} являются одинаковыми (например, все являются метилом или все являются водородом); однако, каждый из R^{13} выбирают независимо, и они могут быть одинаковыми или разными.

Каждый из Y присутствует необязательно. В контексте настоящего описания фраза "присутствует необязательно" означает, что заместитель, указанный как необязательно присутствующий может присутствовать или не присутствовать, и, если заместитель не присутствует, то соседние заместители связаны непосредственно друг с другом. Если Y присутствует, Y представляет собой расщепляемый линкер. В контексте настоящего описания фраза "расщепляемый линкер" относится к любому химическому элементу, соединяющему две части, которые могут быть расщеплены на две отдельные части. Например, расщепляемый линкер может быть расщеплен в результате гидролитического процесса, фотохимического процесса, свободно-радикального процесса, ферментативного процесса, электрохимического процесса или их комбинации. Примеры расщепляемых линкеров включают, без ограничения:

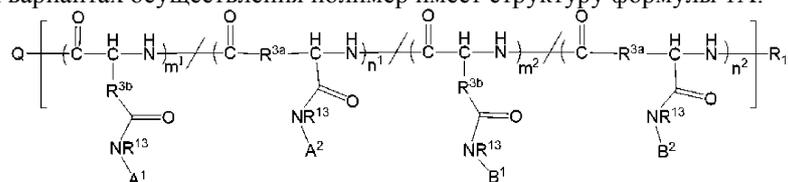


где каждый R^{14} независимо представляет собой C_1 - C_4 -алкильную группу, каждый R^{15} независимо представляет собой водород, арильную группу, гетероциклическую группу (например, ароматическую или неароматическую), C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу,

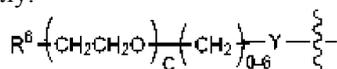
R^{16} представляет собой шестичленную ароматическую или гетероароматическую группу, необязательно замещенную одним или более из: $-OCH_3$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-SCH_3$, $-OH$ или их комбинацией.

Полимер может быть любым подходящим полимером при условии, что этот полимер содержит вышеуказанную полимерную структуру как часть полимера. В некоторых вариантах осуществления полимер является блок-сополимером, содержащим блок полимера, имеющий структуру формулы 1, 1.1 или 1.2, и один или более других блоков полимера (например, субъединицу этиленоксида или субъединицу пропиленоксида). В других вариантах осуществления структура формулы 1, 1.1 или 1.2 представляет собой только полимерное звено полимера, которое может быть "кэпировано" на любом конце подходящим терминальным концом. В некоторых вариантах осуществления полимер дополнительно содержит заместитель, содержащий тканеспецифический или клеточеспецифический нацеливающий фрагмент.

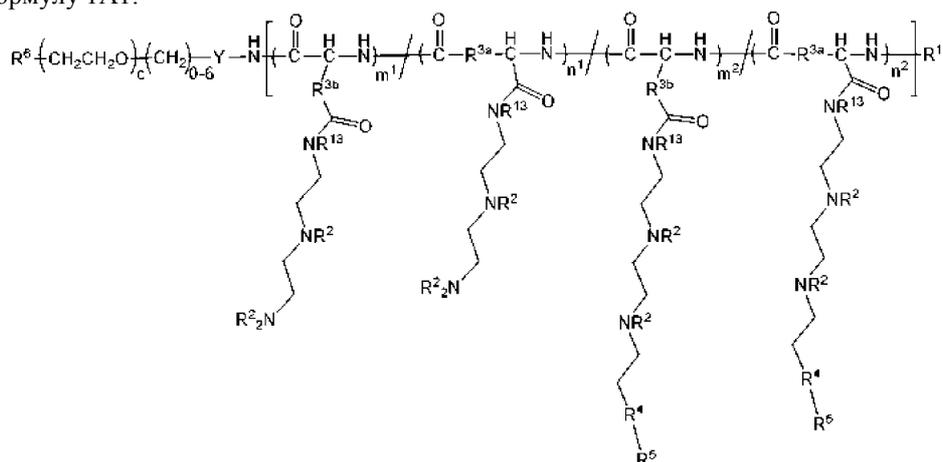
В некоторых вариантах осуществления полимер имеет структуру формулы 1A:



где Q представляет собой формулу:



или формулу 1A1:



где c представляет собой целое число от 0 до 50;

Y необязательно присутствует и является расщепляемым линкером, описанным выше;

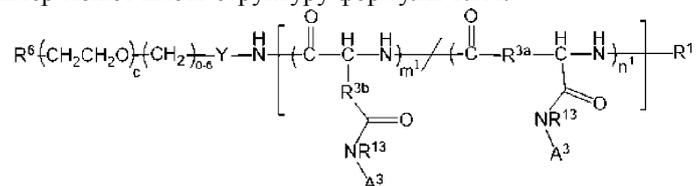
R¹ представляет собой водород, арильную группу, гетероциклическую группу (например, ароматическую или неароматическую), C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу или линейную или разветвленную C₁-C₁₂-алкильную группу, необязательно замещенную одним или более заместителями, такими как один или более аминов;

R⁶ представляет собой водород, аминогруппу, арильную группу, гетероциклическую группу (например, ароматическую или неароматическую), C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, линейную или разветвленную C₁-C₁₂-алкильную группу, необязательно замещенную одним или более аминами; или тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент;

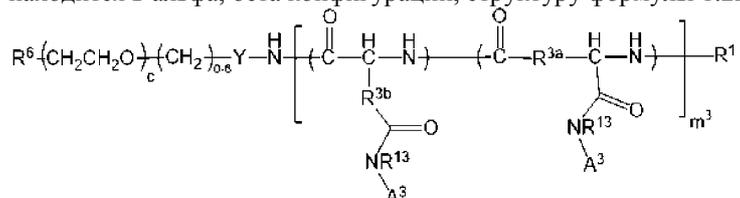
каждый R¹³ независимо представляет собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

и все другие заместители (например, m¹, n¹, m², n², R², R^{3a}, R^{3b}, R⁴, R⁵ и R¹³) являются такими, как описано выше.

Аналогично, полимер может иметь структуру формулы 1.1A:



или, если остов находится в альфа, бета конфигурации, структуру формулы 1.2A:



где c представляет собой целое число от 0 до 50;

Y необязательно присутствует и является расщепляемым линкером, описанным выше;

R¹ представляет собой водород, арильную группу, гетероциклическую группу (например, ароматическую или неароматическую), C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу или линейную или разветвленную C₁-C₁₂-алкильную группу, обяза-

тельно замещенную одним или более заместителями, такими как один или более аминов;

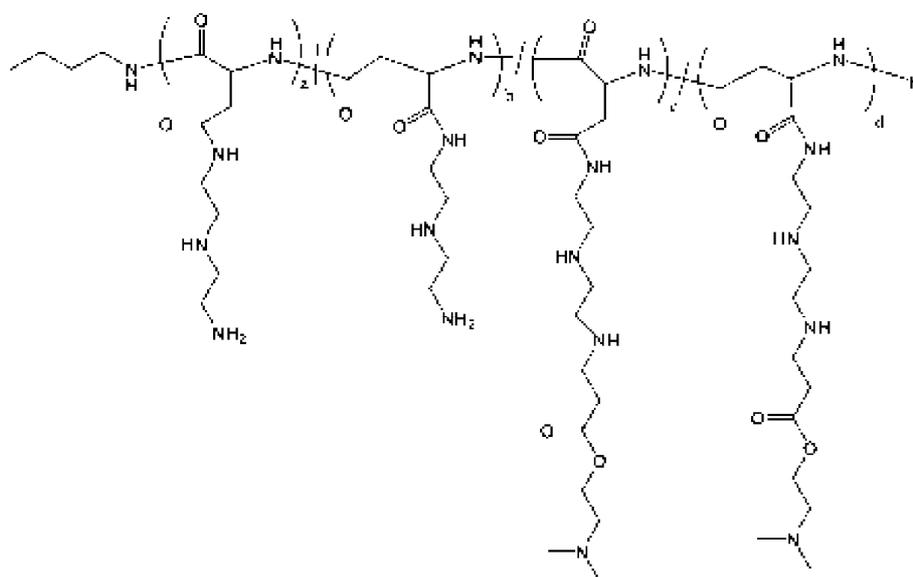
R^6 представляет собой водород, аминогруппу, арильную группу, гетероциклическую группу (например, ароматическую или неароматическую), C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, линейную или разветвленную C_1 - C_{12} -алкильную группу, необязательно замещенную одним или более аминами; или тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент;

каждый R^{13} независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

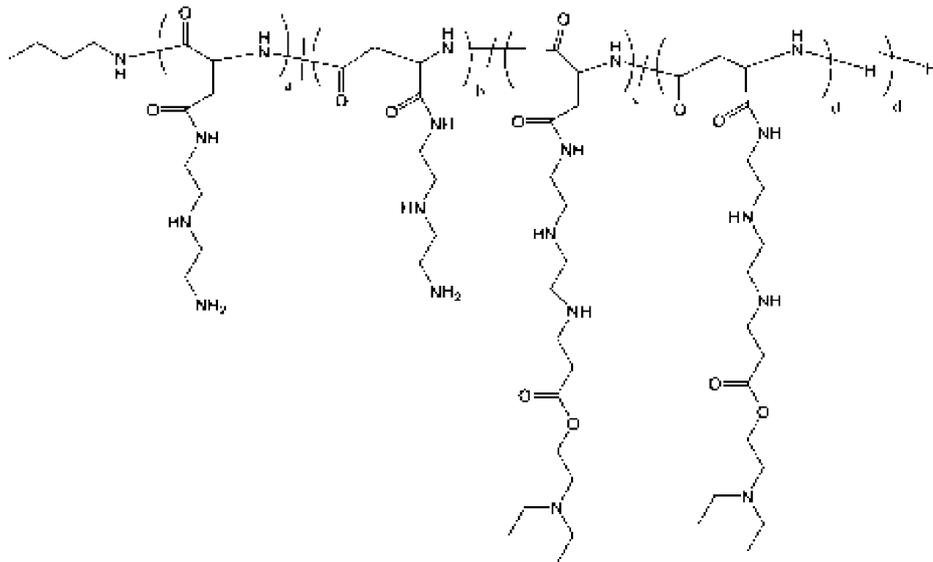
и все другие заместители (например, m^3 , R^{3a} , R^{3b} и A^3) являются такими, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного полимера R^1 и/или R^6 представляет собой линейную или разветвленную C_1 - C_{12} -алкильную группу (например, C_1 - C_{10} -алкильную группу; C_1 - C_8 -алкильную группу; C_1 - C_6 -алкильную группу; C_1 - C_4 -алкильную группу, C_1 - C_3 -алкильную группу или C_1 или C_2 алкильную группу), замещенную одним или более заместителями. В некоторых вариантах осуществления гетероалкильная или алкильная группа содержит или замещена одним или более аминами, например 1-8 или 2-8 (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) вторичными или третичными аминами. Амины могут быть частью гетероалкильной основной цепи или боковыми (подвешенными) заместителями.

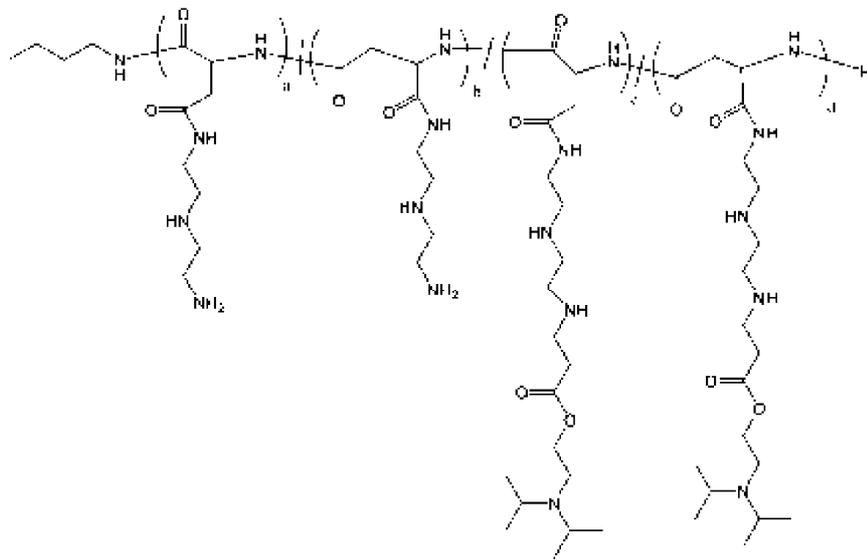
Неограничивающие примеры полимеров, представленных в настоящем описании, включают, например:



Полимер 1

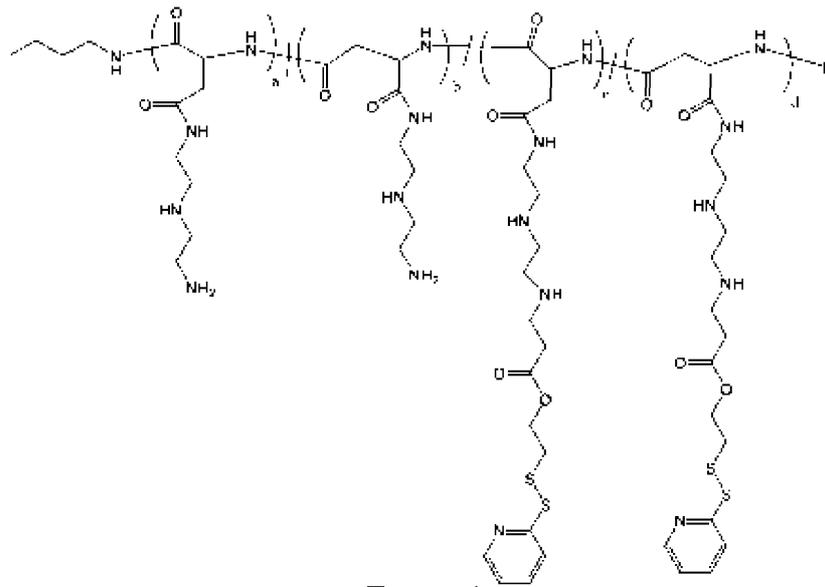


Полимер 2

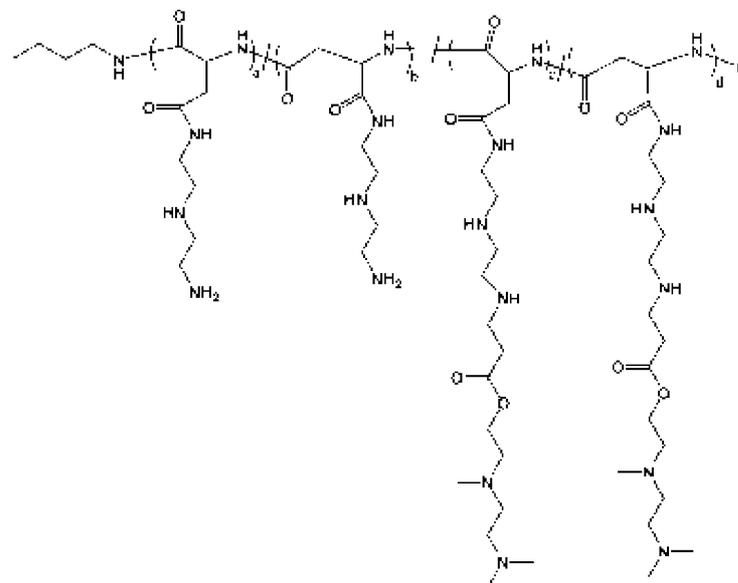


Полимер 3

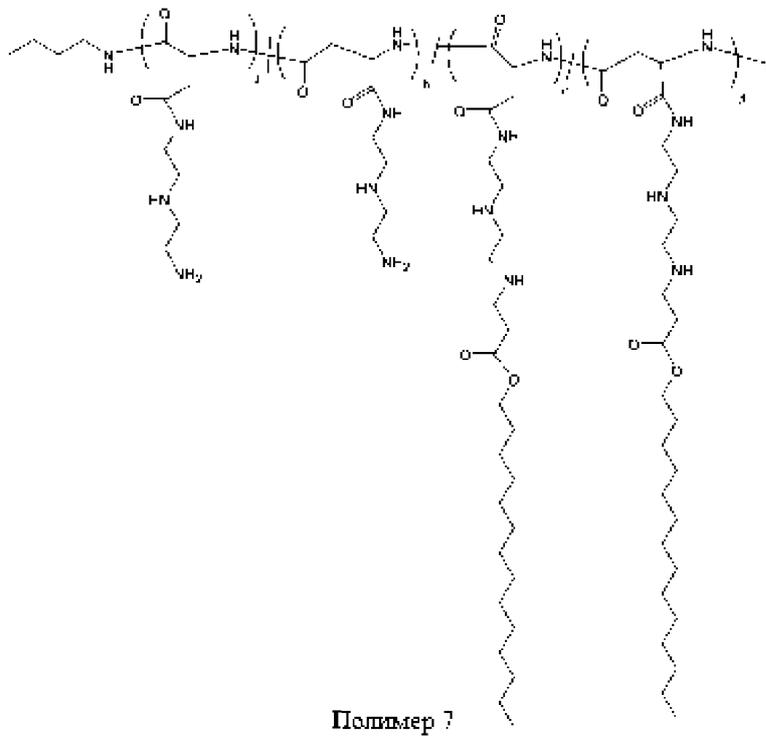
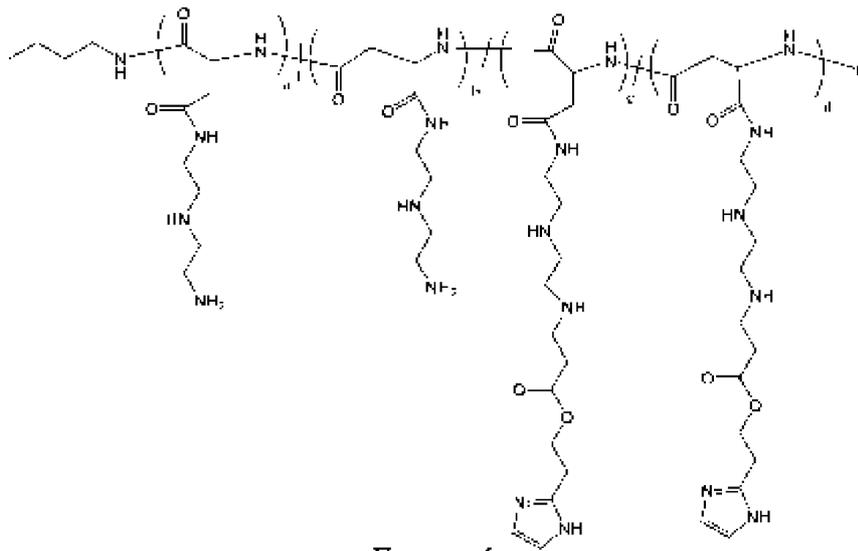
046334

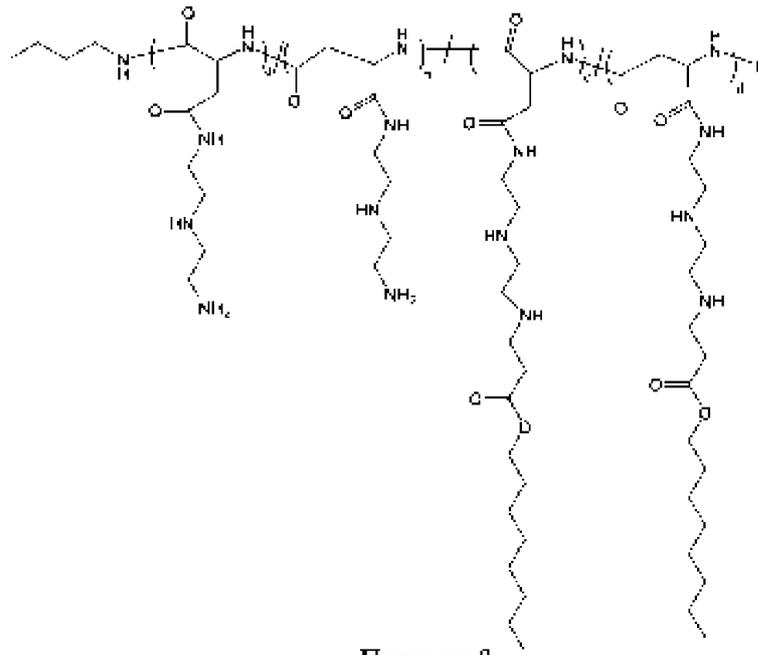


Полимер 4

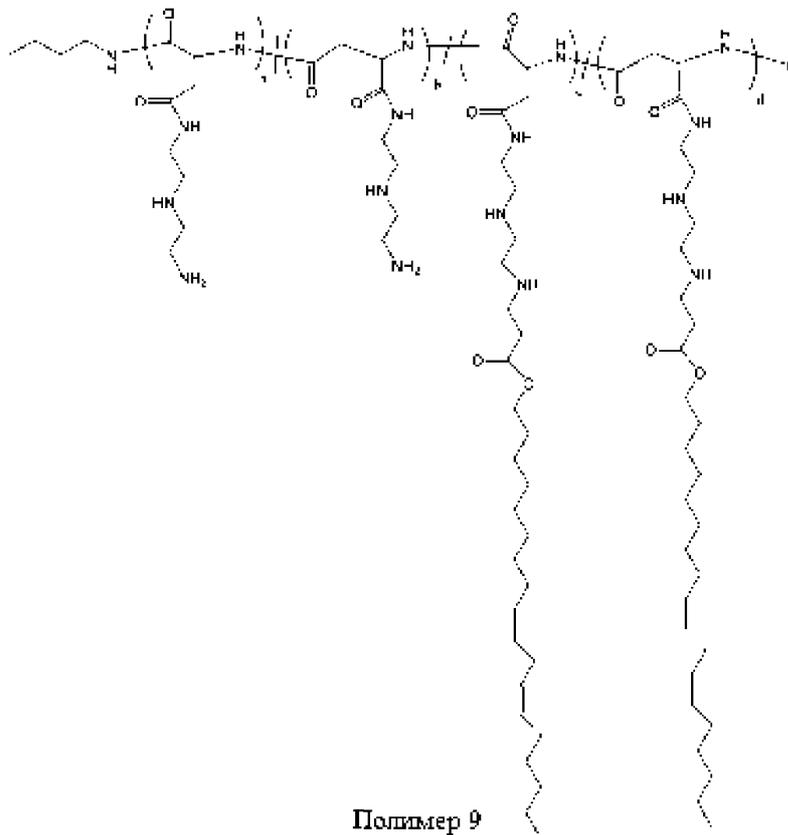


Полимер 5

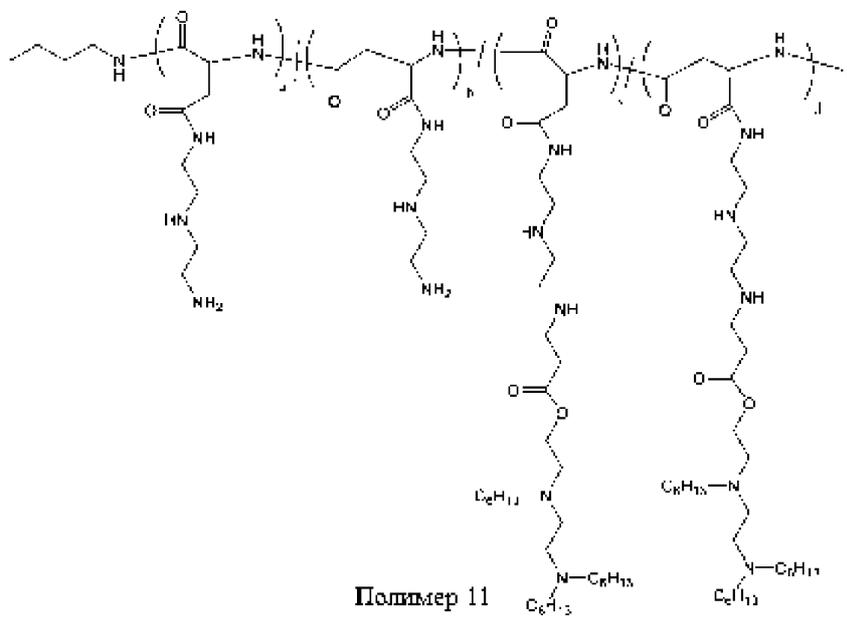
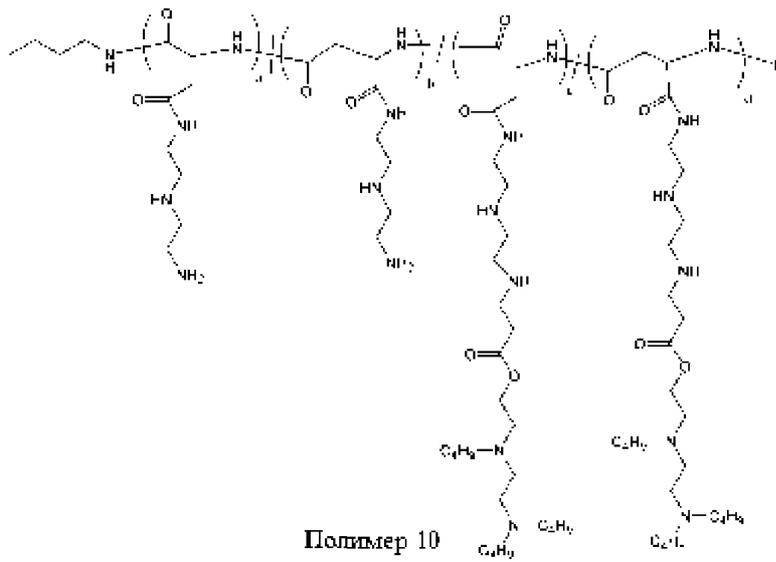


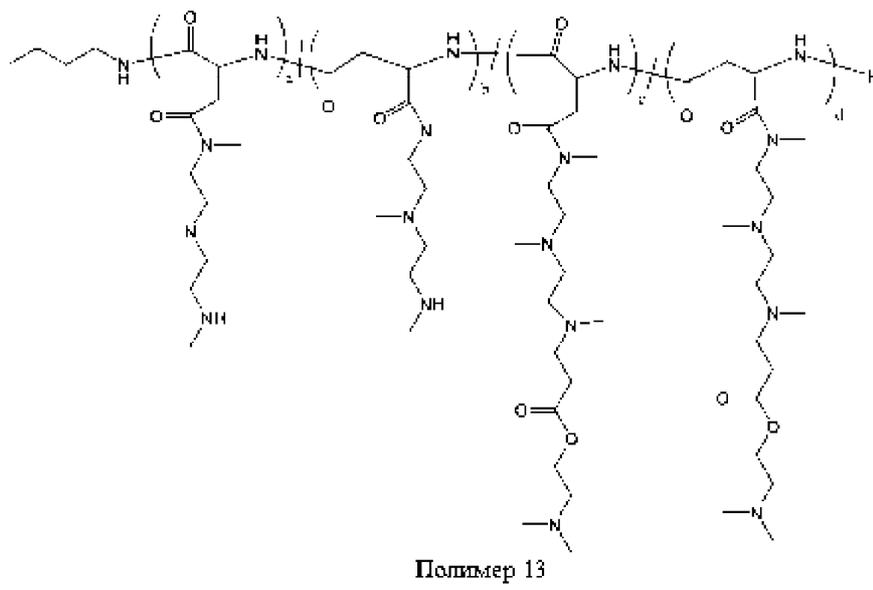
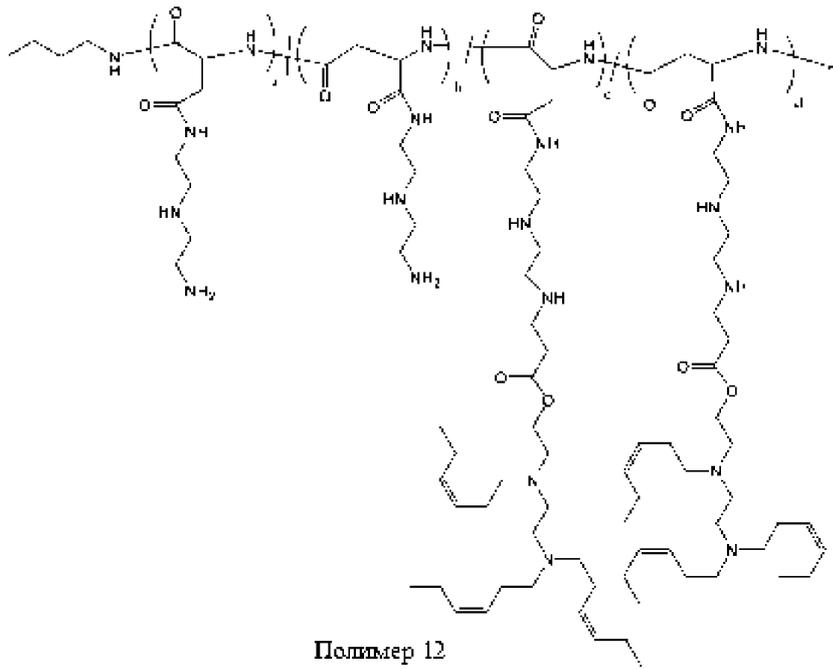


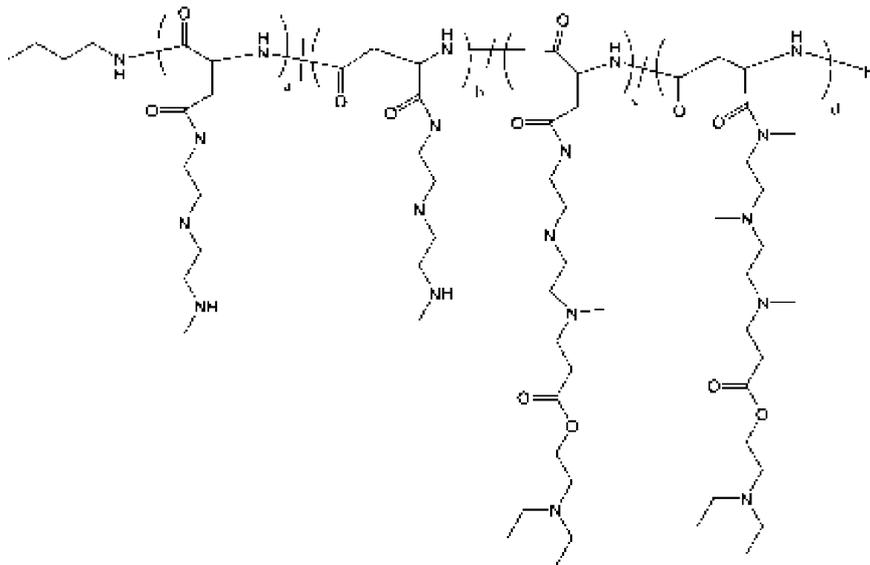
Полимер 8



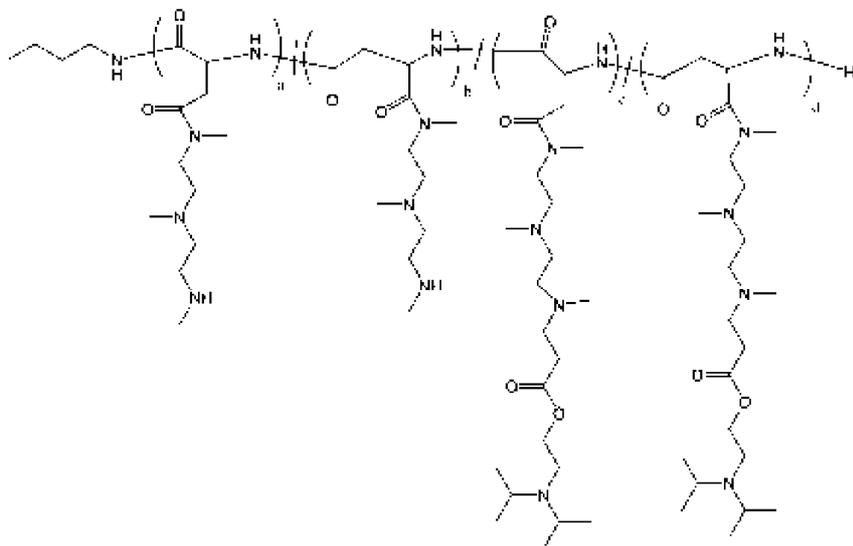
Полимер 9



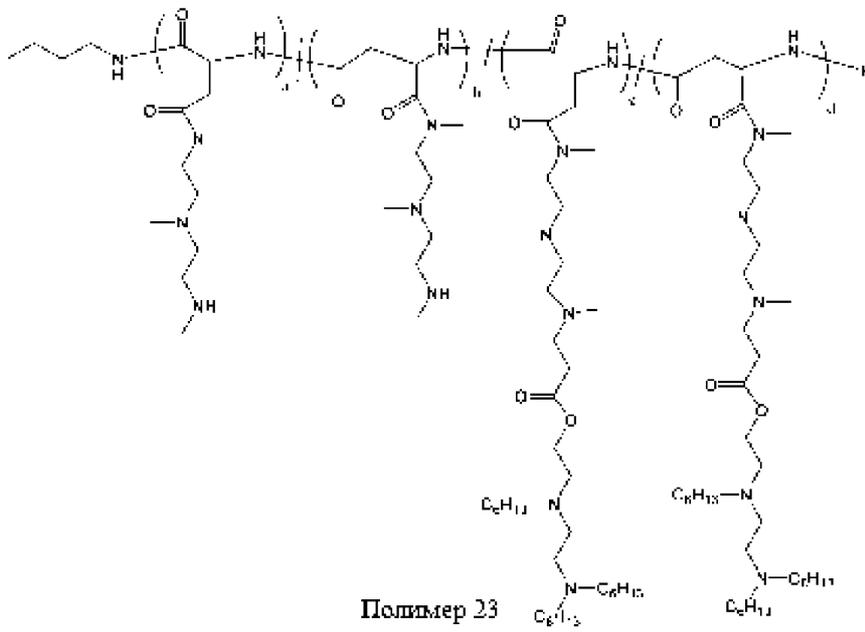
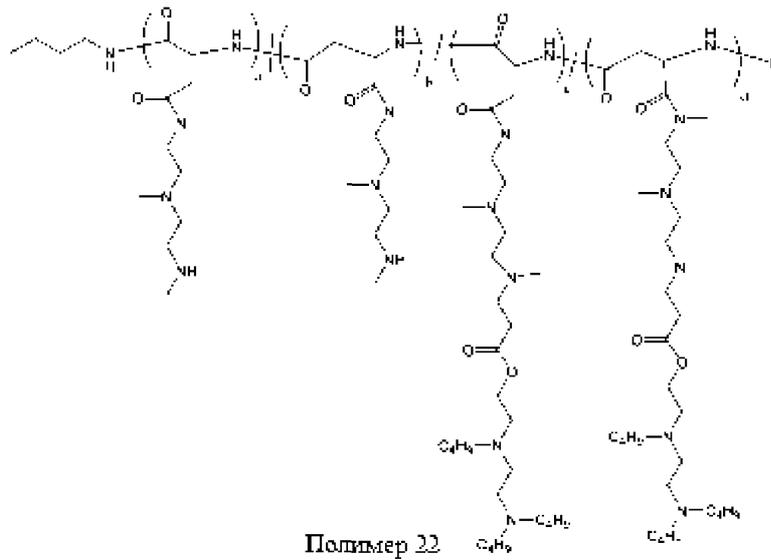


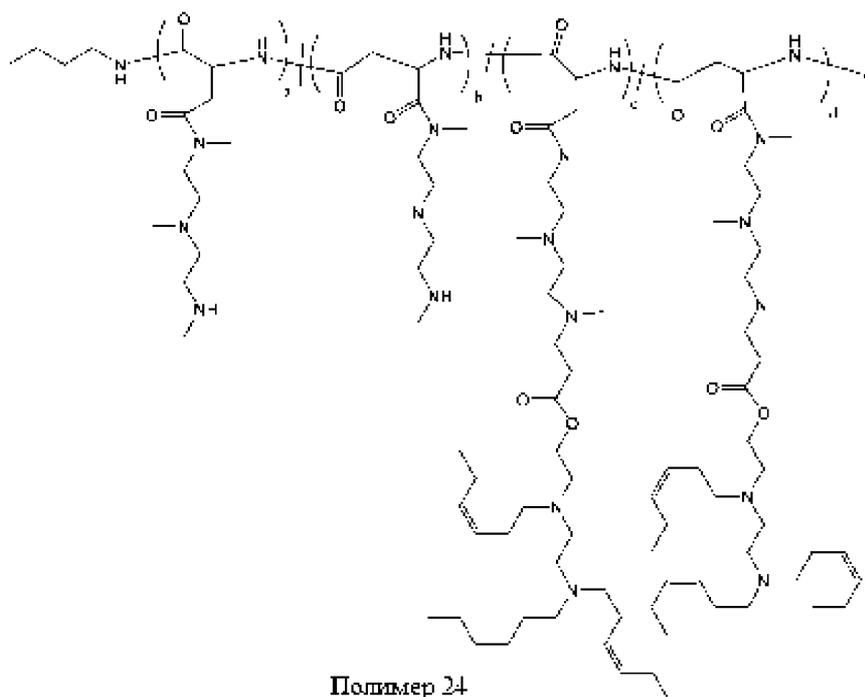


Полимер 14

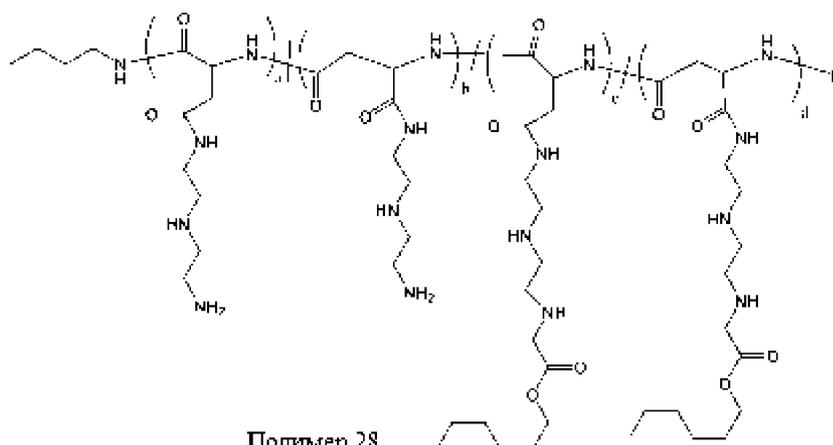


Полимер 15



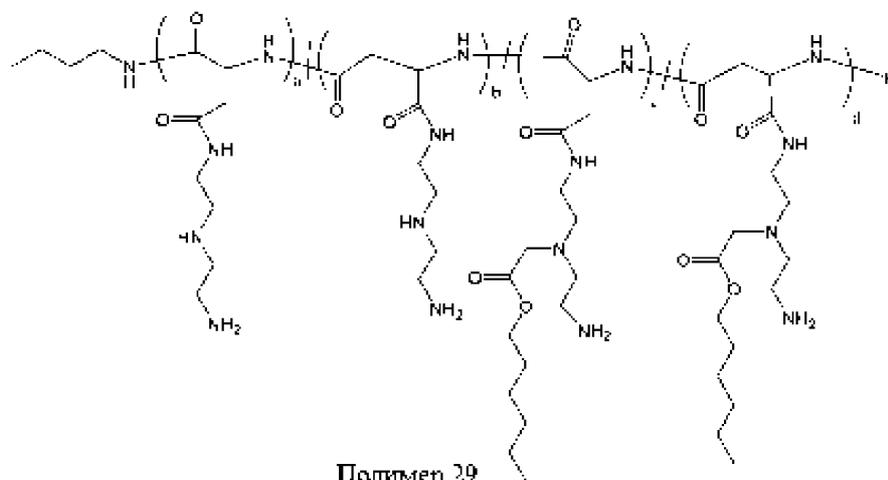


Полимер 24



Полимер 28

или



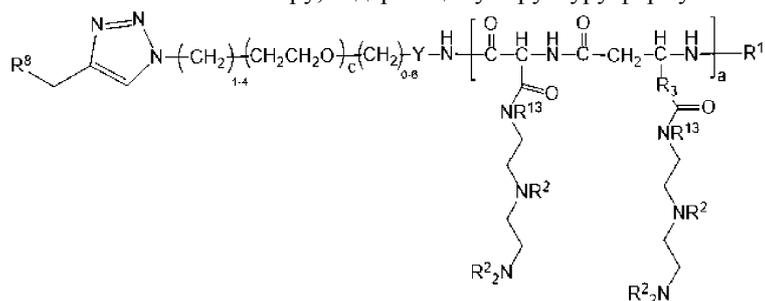
Полимер 29

где каждый из a, b, c и d независимо представляет собой целое число от 0 до 1000, такое как 0-500, 0-200, 0-100 или 0-50, при условии, что $(a+b+c+d) >$ примерно 5. В некоторых вариантах осуществления $(a+b)$ находится в пределах от примерно 0 до примерно 75 (например, от примерно 5 до примерно 75, от примерно 20 до примерно 75, от примерно 40 до примерно 75, от примерно 40 до примерно 60,

от примерно 50 до примерно 75, от примерно 60 до примерно 75 или от примерно 70 до примерно 75), и (c+d) находится в пределах от примерно 5 до примерно 80 (например, от примерно 5 до примерно 75, от примерно 5 до примерно 60, от примерно 5 до примерно 40, от примерно 20 до примерно 40, от примерно 5 до примерно 30, от примерно 5 до примерно 20 или от примерно 5 до примерно 10).

В некоторых вариантах осуществления (a+b) больше чем (c+d). Например, в некоторых вариантах осуществления отношение (a+b)/(c+d) находится в пределах от примерно 1 до примерно 3 (например, (a+b) составляет примерно 55, и (c+d) составляет примерно 25) или отношение (a+b)/(c+d) находится в пределах от примерно 3 до примерно 10 (например, (a+b) составляет примерно 70, и (c+d) составляет примерно 10). В других вариантах осуществления (a+b) меньше, чем (c+d) настолько, что отношение (a+b)/(c+d) меньше 1 (например, примерно 0,1 или более, но меньше чем 1). В этом случае также указание количества звеньев ("a", "b", "c" и "d") в этих приведенных в качестве примера полимерах не подразумевает структуру блок-сополимера; наоборот, эти количества указывают на общее количество звеньев, причем звенья могут быть расположены в случайном порядке, на что указывает символ "/" в этих формулах.

Изобретение также относится к полимеру, содержащему структуру формулы 2:



где a представляет собой целое число от 10 до 2,000;

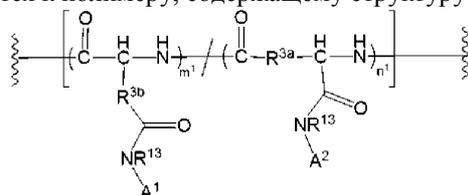
c представляет собой целое число от 0 до 50;

Y необязательно присутствует и является расщепляемым линкером, как представлено выше в настоящем описании;

R¹, R², и R¹³ и все другие группы заместителей являются такими, как описано выше для полимеров, имеющих другие формулы (например, формулы 1, 1A, 1A1, 1.1A и 1.2A); и

R⁸ представляет собой тканеспецифический или клеточеспецифический нацеливающий фрагмент.

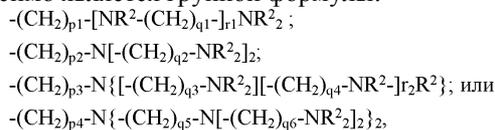
Изобретение также относится к полимеру, содержащему структуру формулы 4:



где каждый из m¹ и n¹ представляет собой целое число от 0 до 1000 при условии, что сумма m¹+n¹ больше чем 2;

символ "/" указывает, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в любом порядке;

каждый из A¹ и A² независимо является группой формулы:



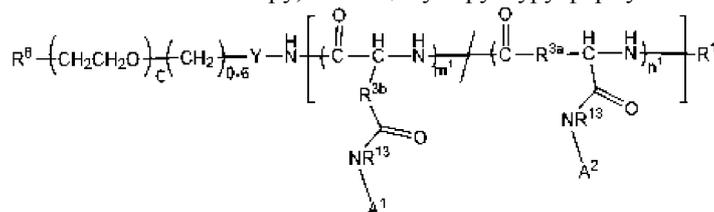
где каждый из p1-p4, q1-q6, и r1 и r2 независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R² независимо представляет собой водород, C₁-C₁₂-алкильную группу, C₁-C₁₂-алкенильную группу, C₃-C₁₂ циклоалкильную группу или C₃-C₁₂ циклоалкенильную группу при условии, что A¹ и A² содержат по меньшей мере один (например, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или даже по меньшей мере пять) третичный амин (например, по меньшей мере некоторые из R² представляют собой C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу);

каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

каждый R¹³ независимо представляет собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу.

Изобретение также относится к полимеру, имеющему структуру формулы 4А:



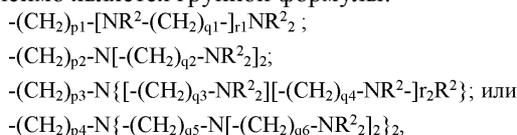
где с представляет собой целое число от 0 до 50;

Y необязательно присутствует и является расщепляемым линкером;

каждый из m¹ и n¹ представляет собой целое число от 0 до 1000 при условии, что сумма m¹+n¹ больше чем 2;

символ "/" указывает, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в любом порядке;

каждый из A¹ и A² независимо является группой формулы:



где каждый из p1-p4, q1-q6 и r1 и r2 независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

R¹ представляет собой водород, арильную группу, гетероциклическую группу (например, ароматическую или неароматическую), C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу или линейную или разветвленную C₁-C₁₂-алкильную группу, необязательно замещенную одним или более заместителями;

каждый R² независимо представляет собой водород, C₁-C₁₂-алкильную группу, C₁-C₁₂-алкенильную группу, C₃-C₁₂ циклоалкильную группу или C₃-C₁₂ циклоалкенильную группу при условии, что A¹ и A² содержат по меньшей мере один (например, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или даже по меньшей мере пять) третичный амин (например, по меньшей мере некоторые из R² представляют собой C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу);

каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

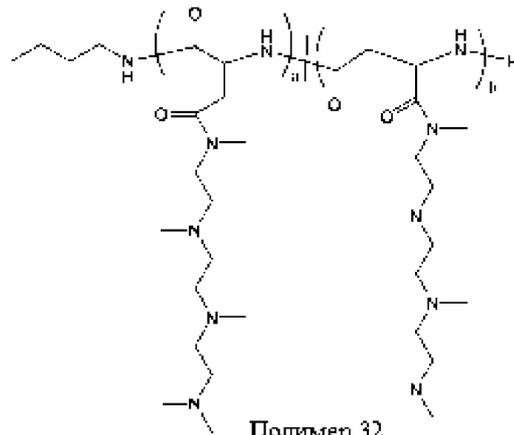
R⁶ представляет собой водород, аминогруппу, арильную группу, гетероциклическую группу (например, ароматическую или неароматическую), C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, линейную или разветвленную C₁-C₁₂-алкильную группу, необязательно замещенную одним или более аминами; или тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент; и

каждый R¹³ независимо представляет собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу.

В вариантах осуществления полимеров, содержащих структуру формулы 4, и полимеров, содержащих структуру формулы 4А, каждый R² независимо представляет собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, C₁-C₁₂-алкенильную группу, C₃-C₁₂-циклоалкильную группу или C₃-C₁₂-циклоалкенильную группу при условии, что каждый из A¹ и A² содержит по меньшей мере один третичный амин (например, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или даже по меньшей мере пять третичных аминов). В некоторых вариантах осуществления каждый R² независимо представляет собой C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу. Соответственно, в вариантах осуществления полимеров, содержащих структуру формулы 4, и полимеров, содержащих структуру формулы 4А, каждый азот, содержащий заместители R², представляет собой третичный амин, за исключением того, что концевой амин может быть первичным, вторичным или третичным амином, предпочтительно вторичным амином или третичным амином.

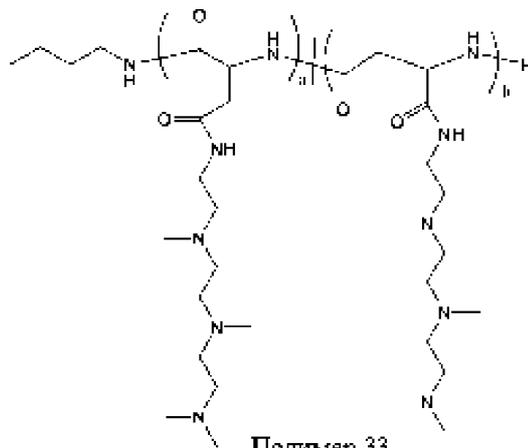
В некоторых вариантах осуществления полимеров, содержащих структуру формулы 4, полимеров, содержащих структуру формулы 4А, каждый из A¹ и A² представляет собой группу формулы -(CH₂)₂-NR²-(CH₂)₂-NR², где каждый R² независимо представляет собой C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, за исключением того, что терминальный амин может быть первичным, вторичным или третичным амином, предпочтительно вторичным или третичным амином. В некоторых вариантах осуществления полимеров, содержащих структуру формулы 4, и полимеров, содержащих структуру формулы 4А, каждый R² представляет собой этил или метил, необязательно за исключением того, что концевой амин может быть первичным, вторичным или третичным амином, предпочтительно вторичным или третичным амином.

В вариантах осуществления полимеров, содержащих структуру формулы 4, и полимеров, содержащих структуру формулы 4А, каждый R¹³ независимо представляет собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу. Как правило, ка-

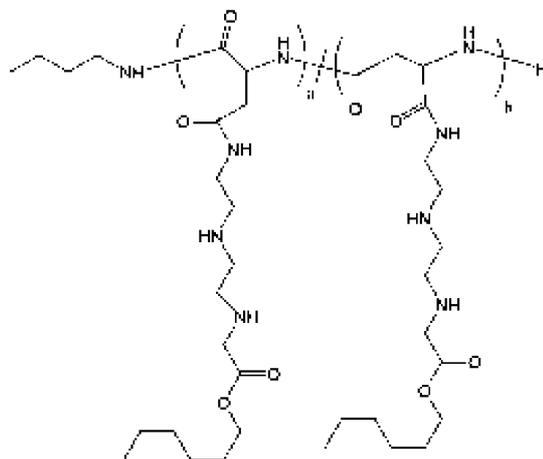


Полимер 32

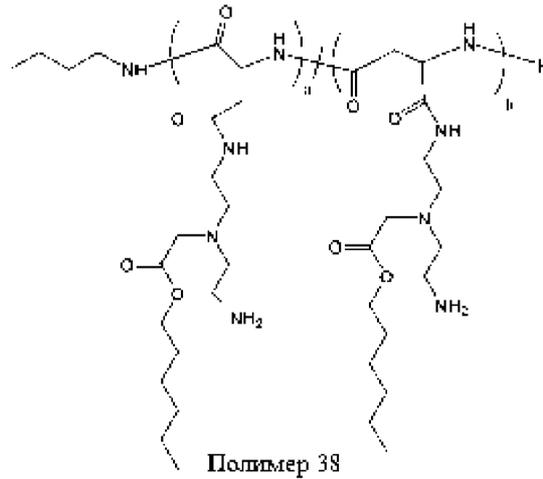
, или



Полимер 33

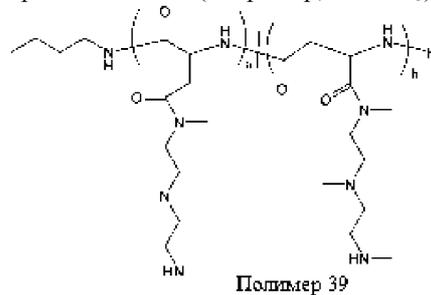


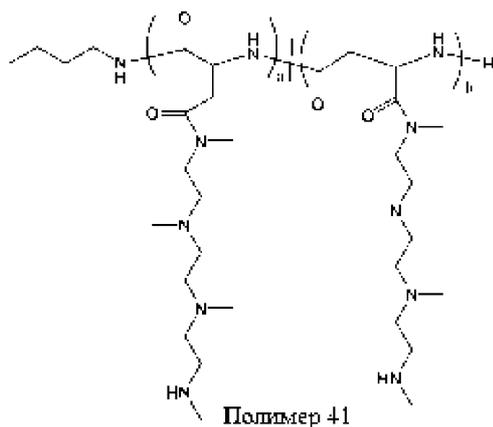
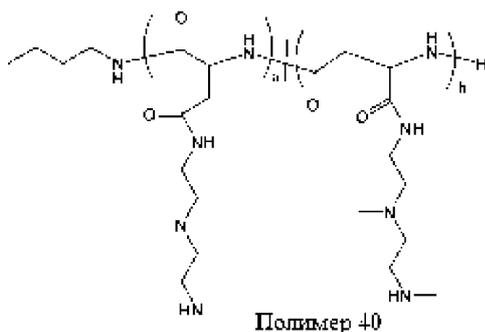
Полимер 37



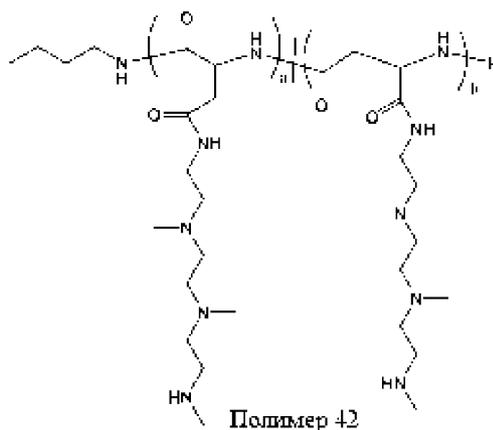
где каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 0 до 1000, такое как 0-500, 0-200, 0-100 или 0-50.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления либо a , либо b может быть равно 0, либо полимер может иметь некоторое отношение a к b . В некоторых вариантах осуществления $(a+b)$ составляет примерно 5 или более (например, от примерно 5 до примерно 160, от примерно 5 до примерно 140, от примерно 5 до примерно 120, от примерно 5 до примерно 100, от примерно 5 до примерно 80 или от примерно 5 до примерно 60) или примерно 25 или более (например, от примерно 25 до примерно 160, от примерно 25 до примерно 140, от примерно 25 до примерно 120, от примерно 25 до примерно 100, от примерно 25 до примерно 80 или от примерно 25 до примерно 60) или даже примерно 50 или более (например, от примерно 50 до примерно 160, от примерно 50 до примерно 140, от примерно 50 до примерно 120, от примерно 50 до примерно 100 или от примерно 50 до примерно 80). Дополнительные примеры включают полимеры 30-33, в которых концевой третичный амин одной или обеих боковых цепей деметилирован с образованием вторичного амина (например, $-NHCH_3$):





, или



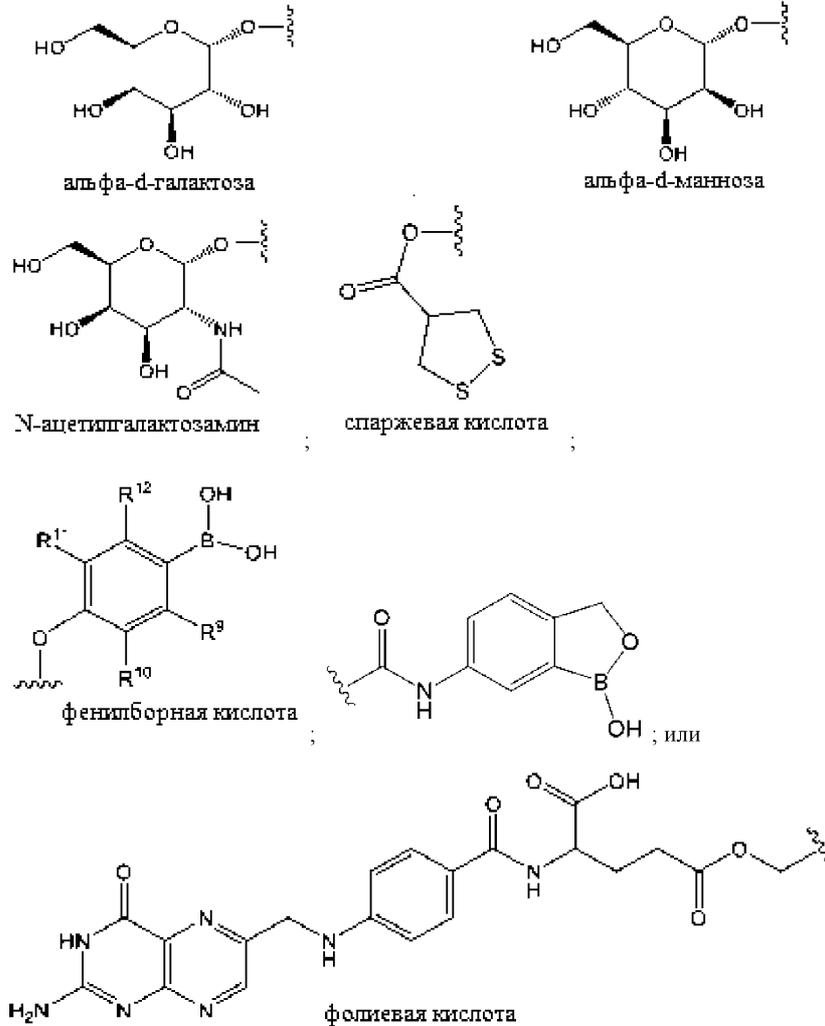
где а и в являются такими, как описано выше.

Любой из вышеперечисленных полимеров может включать тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент в положении, указанном в описанных формулах, или полимеры могут быть модифицированы иным образом так, чтобы они включали тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент. Способы присоединения тканеспецифического или клеткоспецифического нацеливающего фрагмента известны в данной области, некоторые из них включают реакцию присоединения по Михаэлю, раскрытие эпоксидного кольца, реакцию замещения или "клик"-химию (например, CuAAC, SPAAC, SPANC или реакцию напряженных алкенов), в которых используется тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент с соответствующими функциональными группами. Тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент может представлять собой любую малую молекулу, белок (например, антитело или антиген), аминокислотную последовательность, сахар, олигонуклеотид, наночастицу на основе металла или их комбинацию, способные распознавать (например, специфически связываться с) заданную целевую ткань или клетку (например, специфически связываться с конкретным лигандом, рецептором или другим белком или молекулой, что позволяет целевому фрагменту отличать целевую ткань или клетку от другой ткани или клетки, которые не являются целевыми). В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент представляет собой рецептор лиганда. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент представляет собой лиганд рецептора.

Тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент можно использовать для

нацеливания на любую требуемую ткань или тип клеток. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент локализует полимер в тканях периферической нервной системы, центральной нервной системы, печени, мышц (например, сердечной мышцы), легких, костей (например, кроветворных клеток) или глаза субъекта. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент локализует полимер в опухолевых клетках. Например, тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент может представлять собой сахар, который связывается с рецептором на конкретной ткани или клетке.

В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент представляет собой:



где каждый из R^9 , R^{10} , R^{11} и R^{12} независимо представляет собой водород, галоген, C_1 - C_4 -алкил или C_1 - C_4 -алкокси, независимо замещенные одной или более аминогруппами.

Указанные тканеспецифические или клеткоспецифические нацеливающие фрагменты могут быть выбраны для обеспечения локализации полимера в ткани, как раскрыто в настоящем описании. Например, альфа-d-маннозу можно использовать для локализации полимера в периферической нервной системе, центральной нервной системе или иммунных клетках, альфа-d-галактозу и N-ацетилгалактозамин можно использовать для локализации полимера в гепатоцитах печени, и фолиевую кислоту можно использовать для локализации полимера в опухолевых клетках.

Обычно полимер является катионным (т.е. положительно заряженным при pH 7 и 23°C). Используемый в настоящем описании термин "катионный" относится к полимерам, имеющим общий суммарный положительный заряд, независимо от того, содержит ли полимер только катионные мономерные звенья или комбинацию катионных мономерных звеньев и неионных или анионных мономерных звеньев.

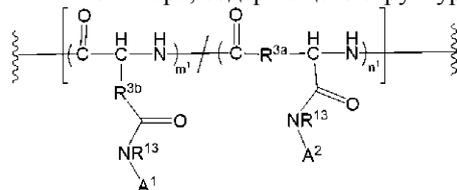
В некоторых вариантах осуществления полимер имеет средневесовую молекулярную массу от примерно 5 до примерно 2000 кДа, например, от примерно 10 до примерно 2000 кДа. Полимер может иметь средневесовую молекулярную массу, составляющую примерно 2000 кДа или меньше, например, примерно 1800 кДа или меньше, примерно 1600 кДа или меньше, примерно 1400 кДа или меньше, примерно 1200 кДа или меньше, примерно 1000 кДа или меньше, примерно 900 кДа или меньше,

примерно 800 кДа или меньше, примерно 700 кДа или меньше, примерно 600 кДа или меньше, примерно 500 кДа или меньше, примерно 100 кДа или меньше, или примерно 50 кДа или меньше, или даже примерно 40 кДа или меньше, например, примерно 30 кДа или меньше или 25 кДа или меньше. Альтернативно или дополнительно, полимер может иметь средневесовую молекулярную массу, составляющую примерно 5 кДа или более или примерно 10 кДа или более, например, примерно 50 кДа или более, примерно 100 кДа или более, примерно 200 кДа или более, примерно 300 кДа или более или примерно 400 кДа или более. Таким образом, полимер может иметь средневесовую молекулярную массу, ограниченную любыми двумя из вышеупомянутых конечных точек. Например, полимер может иметь средневесовую молекулярную массу, составляющую от примерно 5 до примерно 50 кДа, от примерно 10 до примерно 50 кДа, от примерно 10 до примерно 100 кДа, от примерно 10 до примерно 500 кДа, от примерно 50 до примерно 500 кДа, от примерно 100 до примерно 500 кДа, от примерно 200 до примерно 500 кДа, от примерно 300 до примерно 500 кДа, от примерно 400 до примерно 500 кДа, от примерно 400 до примерно 600 кДа, от примерно 400 до примерно 700 кДа, от примерно 400 до примерно 800 кДа, от примерно 400 до примерно 900 кДа, от примерно 400 до примерно 1000 кДа, от примерно 400 до примерно 1200 кДа, от примерно 400 до примерно 1400 кДа, от примерно 400 до примерно 1600 кДа, от примерно 400 до примерно 1800 кДа, от примерно 400 до примерно 2000 кДа, от примерно 200 до примерно 2000 кДа, от примерно 500 до примерно 2000 кДа или от примерно 800 до примерно 2000 кДа.

Средневесовую молекулярную массу можно определить любым подходящим методом. Обычно средневесовую молекулярную массу определяют с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке, выбранной из TSKgel Guard, GMPW, GMPW, G1000PW, с помощью детектора показателя преломления Waters 2414 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts). Кроме того, средневесовую молекулярную массу определяют с помощью калибровки, используя в качестве стандарта полиэтиленоксид/полиэтиленгликоль с молекулярным весом в диапазоне от 150 до 875000 Да.

Способы приготовления

Предлагаемые полимеры могут быть получены любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть получены способом, который включает модификацию по меньшей мере части групп A¹ и/или A² полимера, содержащего структуру формулы 3:



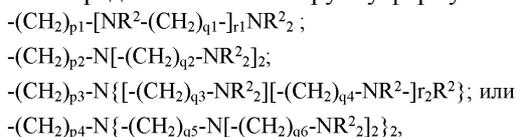
где каждый из m¹ и n¹ представляет собой целое число от 0 до 1000 при условии, что m¹+n¹ больше чем 5;

символ "/" указывает, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в любом порядке;

каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

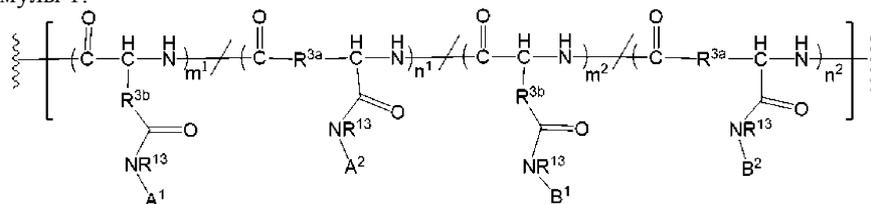
каждый R¹³ независимо представляет собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый из A¹ и A² независимо представляет собой группу формулы:



где каждый из p₁-p₄, q₁-q₆ и r₁ и r₂ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R² независимо представляет собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу с образованием полимера, содержащего структуру формулы 1:



где m¹ и n¹ представляет собой целое число от 0 до 1000;

каждый из m² и n² представляет собой целое число от 0 до 1000 при условии, что сумма m²+n² больше чем 5;

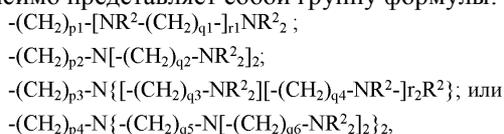
символ "/" указывает, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в лю-

бом порядке;

каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

каждый R^{13} независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый из A^1 и A^2 независимо представляет собой группу формулы:



каждый из V^1 и V^2 независимо представляет собой:



где каждый из $p1$ - $p4$, $q1$ - $q6$, $r1$ и $r2$ и $s1$ - $s4$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

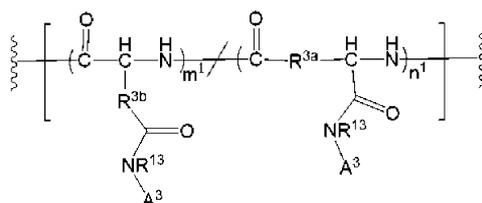
каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый R^4 независимо представляет собой $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$ или $-S(O)(O)-$;

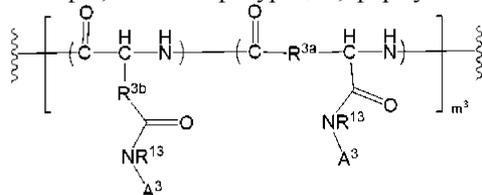
каждый R^5 независимо представляет собой алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 или от 2 до 8 вторичных или третичных аминов, или заместитель, содержащий тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент.

Полимер, содержащий структуру формулы 1, полученный этим способом, может быть любым полимером формулы 1, включая формулы 1.1, 1.2, 1A1, 1A, 1.1A, 1.2A, 4 или 4A, а также любые их варианты осуществления, как описано в отношении полимера по изобретению.

Полимер, содержащий структуру формулы 3, может быть любым подходящим полимером, отвечающим этим критериям. В некоторых вариантах осуществления полимер альтернативно может быть описан формулой 3.1:



или, если остов находится в альфа-, бета-конфигурации, формулой 3.2:



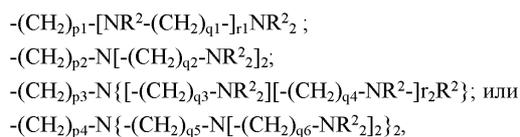
где m^3 представляет собой целое число от 5 до 2000 (например, 5-1000, 5-500, 5-100, 25-2000, 25-500, 25-100, 50-2000, 50-1000, 50-500 или 50-100);

символ "/" указывает, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в любом порядке;

каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

каждый R^{13} независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый A^3 независимо представляет собой группу формулы:



где каждый из $p1-p4$, $q1-q6$ и $r1$ и $r2$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;
каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1-C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу.

В этом случае способ может включать модификацию по меньшей мере части групп A^3 , достаточную для получения полимера со структурой формулы 1.1 или 1.2, как раскрыто в настоящем описании. Примером полимера, содержащего одну из следующих структур, является $p\text{Asp}(\text{DET})$ (поли(2-[(2-аминоэтил)амино]этил)аспартамид)) или $\text{PEG-}p\text{Asp}(\text{DET})$ (полиэтиленгликоль- b -поли{ N' -[N -(2-аминоэтил)-2-аминоэтил]аспартамид}).

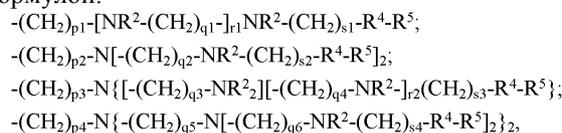
Группы, обозначенные A^1 и/или A^2 (или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2), могут быть модифицированы любыми подходящими средствами для получения групп, обозначенных B^1 и/или B^2 (или группы A^3 полимера формулы 1.1 или 1.2).

Например, группы, обозначенные A^1 и/или A^2 (или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2), могут быть модифицированы с помощью реакции присоединения по Михаэлю, раскрытия эпоксидного кольца или реакции замещения. В предпочтительных вариантах осуществления группы, обозначенные A^1 и/или A^2 (или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2), модифицированы с помощью реакции присоединения по Михаэлю.

В одном из вариантов осуществления группы A^1 и/или A^2 полимера, содержащего структуру формулы 3, или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2, модифицированы с помощью реакции присоединения по Михаэлю, осуществляемой между полимером, содержащим структуру формулы 3, и α,β -ненасыщенным карбонильным соединением. В контексте настоящего описания термин "присоединение по Михаэлю" относится к нуклеофильному присоединению нуклеофила полимера (например, карбаниона, аниона кислорода, аниона азота, атома кислорода, атома азота или их комбинации) к α,β -ненасыщенному карбонильному соединению. Соответственно, реакция присоединения по Михаэлю осуществляется между полимером, содержащим структуру формулы 3, и α,β -ненасыщенным карбонильным соединением. В некоторых вариантах осуществления нуклеофил полимера является анионом азота, атомом азота ли их комбинацией.

α,β -Ненасыщенное карбонильное соединение может представлять собой любое α,β -ненасыщенное карбонильное соединение, способное принимать нуклеофил по реакции присоединения по Михаэлю. В некоторых вариантах осуществления α,β -ненасыщенное карбонильное соединение является акрилатом, акриламидом, винилсульфоном или их комбинацией. Соответственно, реакция присоединения по Михаэлю может происходить между полимером, содержащим структуру формулы 3, и акрилатом, акриламидом, винилсульфоном или их комбинацией. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ содержит приведение в контакт полимера, содержащего структуру формулы 3, и акрилата; приведение в контакт полимера, содержащего структуру формулы 3, и акриламида; или приведение в контакт полимера, содержащего структуру формулы 3, и винилсульфона.

В вариантах осуществления, в которых группы, обозначенные A^1 и/или A^2 (или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2), модифицированы с помощью реакции присоединения по Михаэлю, эти группы образуют группы, обозначенные B^1 и/или B^2 , определенные в настоящем описании в отношении формул 1, 1.1, 1.2, 1A, 1A1, и т.д. (или группы A^3 полимера формулы 1.1 или 1.2). Например, группы B^1 и/или B^2 могут быть представлены формулой:

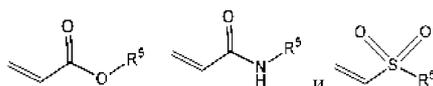


где каждый из $p1-p4$, $q1-q6$, $r1$ и $r2$ и $s1-s4$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;
каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1-C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу; каждый R^4 независимо представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ или $-\text{S}(\text{O})(\text{O})-$;

каждый R^5 независимо представляет собой алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 или от 2 до 8 вторичных или третичных аминов, или заместитель, содержащий тканеспецифический или клеточеспецифический нацеливающий фрагмент; или

в других случаях группы и заместители могут быть такими, как они определены в отношении полимеров по изобретению.

Примеры подходящих для использования акрилатов, акриламидов и винилсульфонов включают акрилат формулы:



где R^5 является таким, как определено отношении любой из формул 1, 1.1, 1.2, 1A, 1.1A или 1.2A.

В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции присоединения по Михаэлю используют кислоту и/или основание. Кислота и/или основание могут быть любой подходящей кислотой и/или основанием с любым подходящим значением рКа. Кислота и/или основание могут представлять собой органическую кислоту (например, *p*-толуолсульфоновую кислоту), органическое основание (например, триэтиламин), неорганическую кислоту (например, тетрахлорид титана), неорганическое основание (например, карбонат калия) или их комбинацию.

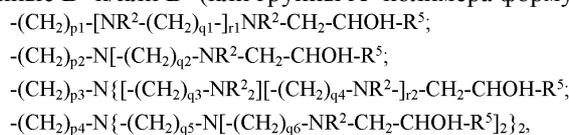
В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции присоединения по Михаэлю используют кислоту. Кислота может представлять собой кислоту Брэнстеда или кислоту Льюиса. В вариантах осуществления, в которых кислота представляет собой кислоту Брэнстеда, кислота может быть слабой кислотой (т.е. с рКа от примерно 4 до примерно 7) или сильной кислотой (т.е. с рКа от примерно -2 до примерно 4). Обычно кислота является слабой кислотой. В некоторых вариантах осуществления кислота представляет собой кислоту Льюиса. Например, кислота может представлять собой бис-(трифторметансульфон)имид или *p*-толуолсульфоновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции присоединения по Михаэлю используют основание. Основание может представлять собой слабое основание (т.е. с рКа от примерно 7 до примерно 12) или сильное основание (т.е. с рКа от примерно 12 до примерно 50). Обычно основание представляет собой слабое основание. Например, основание может представлять собой триэтиламин, диизопропилэтиламин, пиридин, *N*-метил морфолин или *N,N*-диметил-пиперазин или их производные.

В некоторых вариантах осуществления реакцию присоединения по Михаэлю выполняют в растворителе. Растворитель может быть любым подходящим растворителем или смесью растворителей, способных сольбилизовать полимер и α,β -ненасыщенное карбонильное соединение для осуществления реакции. Например, растворитель может включать воду, протонные органические растворители и/или апротонные органические растворители. Приведенный в качестве примера список растворителей включает воду, дихлорметан, диэтиловый эфир, диметилсульфоксид, ацетонитрил, метанол и этанол.

В одном из вариантов осуществления группы A^1 и/или A^2 (или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2) полимера модифицированы с помощью реакции раскрытия эпоксидного кольца между полимером и эпоксидным соединением. В контексте настоящего описания термин "раскрытие эпоксидного кольца" относится к нуклеофильному присоединению нуклеофила полимера (например, карбаниона, аниона кислорода, аниона азота, атома кислорода, атома азота или их комбинации) к эпоксидному соединению, таким образом раскрывая эпоксидное кольцо. Соответственно, реакция раскрытия эпоксидного кольца осуществляется между полимером и эпоксидным соединением. В некоторых вариантах осуществления нуклеофилом полимера является анион азота, атом азота или их комбинация.

В вариантах осуществления, в которых группы, обозначенные A^1 и/или A^2 (или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2), модифицированы с помощью реакции раскрытия эпоксидного кольца, эти группы образуют группы, обозначенные B^1 и/или B^2 (или группы A^3 полимера формулы 1.1 или 1.2) формулы:



где каждый из $p1$ - $p4$, $q1$ - $q6$ и $r1$ и $r2$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый R^5 независимо представляет собой алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 или от 2 до 8 вторичных или третичных аминов, или заместитель, содержащий тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент.

Примеры эпоксидов, подходящих для применения, включают эпоксиды формулы:



где R^5 является таким, как определено в отношении любого полимера по изобретению (например, формулы 1, 1.1, 1.2, 1A, 1.1A или 1.2A).

В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции раскрытия эпоксидного кольца используют кислоту и/или основание. Кислота и/или основание могут быть любой подходящей

кислотой и/или основанием с любым подходящим значением рКа. Кислота и/или основание могут представлять собой органическую кислоту (например, *p*-толуолсульфоновую кислоту), органическое основание (например, триэтиламин), неорганическую кислоту (например, тетрагидрид титана), неорганическое основание (например, карбонат калия) или их комбинацию.

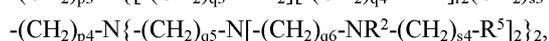
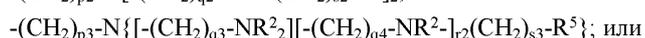
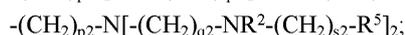
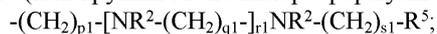
В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции раскрытия эпоксидного кольца используют кислоту. Кислота может представлять собой кислоту Брэнстеда или кислоту Льюиса. В вариантах осуществления, в которых кислота представляет собой кислоту Брэнстеда, кислота может быть слабой кислотой (т.е. с рКа от примерно 4 до примерно 7) или сильной кислотой (т.е. с рКа от примерно -2 до примерно 4). Обычно кислота является слабой кислотой. В некоторых вариантах осуществления кислота представляет собой кислоту Льюиса. Например, кислота может представлять собой бис-(трифторметансульфон)имид или *p*-толуолсульфоновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции раскрытия эпоксидного кольца используют основание. Основание может представлять собой слабое основание (т.е. с рКа от примерно 7 до примерно 12) или сильное основание (т.е. с рКа от примерно 12 до примерно 50). Обычно основание представляет собой слабое основание. Например, основание может представлять собой триэтиламин, диизопропилэтиламин, пиридин, *N*-метилморфолин или *N,N*-диметилпиперазин или их производные.

В некоторых вариантах осуществления реакцию раскрытия эпоксидного кольца выполняют в растворителе. Растворитель может быть любым подходящим растворителем или смесью растворителей, способных сольватировать полимер и эпоксидное соединение для осуществления реакции. Например, растворитель может включать воду, протонные органические растворители и/или апротонные органические растворители. Приведенный в качестве примера список растворителей включает воду, дихлорметан, диэтиловый эфир, диметилсульфоксид, ацетонитрил, метанол и этанол.

В одном из вариантов осуществления группы A^1 и/или A^2 (или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2) полимера модифицированы с помощью реакции замещения, проводимой между полимером и соединением, содержащим уходящую группу (например, хлорид, бромид, иодид, тозилат, трифлат, мезилат и т.п.). В контексте настоящего описания термин "замещение" относится к нуклеофильному присоединению нуклеофила полимера (например, карбаниона, аниона кислорода, аниона азота, атома кислорода, атома азота или их комбинации) к соединению, содержащему уходящую группу. Соответственно, реакция замещения осуществляется между полимером и соединением, содержащим уходящую группу. В некоторых вариантах осуществления нуклеофил полимера является анионом азота, атомом азота или их комбинацией.

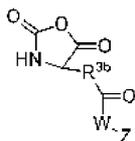
В вариантах осуществления, в которых группы, обозначенные A^1 и/или A^2 (или группа A^3 полимера формулы 3.1 или 3.2), модифицированы с помощью реакции замещения, эти группы образуют группы, обозначенные B^1 и/или B^2 (или группы A^3 полимера формулы 1.1 или 1.2) формулы:



где каждый из $p1$ - $p4$, $q1$ - $q6$, $r1$ и $r2$ и $s1$ - $s4$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5; каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

каждый R^5 независимо представляет собой алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 или от 2 до 8 вторичных или третичных аминов, или заместитель, содержащий тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления способ содержит получение полимера, содержащего структуру формулы 5, из соединения формулы А:



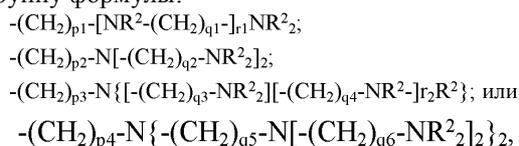
где R^{3b} представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

W представляет собой $-NR^{14}$ - или $-O-$, где R^{14} представляет собой водород или C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу;

Z представляет собой A^1 или алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, арилалкильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 или от 2 до 8 вторичных или третичных аминов, или заместитель, содержащий тканеспецифический или клеткоспецифический

нацеливающий фрагмент;

A¹ представляет собой группу формулы:

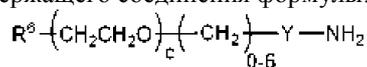


где каждый из p1-p4, q1-q6 и r1 и r2 независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R² независимо представляет собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу.

Как правило, способ, содержащий образование полимера, содержащего структуру формулы 5, из соединения формулы А, включает полимеризацию с раскрытием кольца соединения формулы А. Полимеризация с раскрытием кольца соединения формулы А может быть инициирована любым подходящим способом (например, с помощью температуры, света, катализатора, соединения и т.п.). В некоторых вариантах осуществления полимеризацию с раскрытием кольца соединения формулы А инициируют с помощью амин-содержащего соединения.

В некоторых вариантах осуществления полимеризацию с раскрытием кольца соединения формулы А инициируют с помощью амин-содержащего соединения формулы:

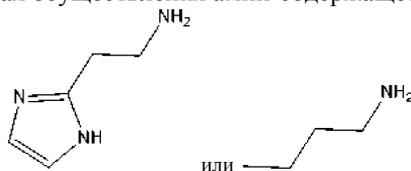


где c представляет собой целое число от 0 до 50;

Y необязательно присутствует и представляет собой расщепляемый линкер;

R⁶ представляет собой водород, аминогруппу, арильную группу, гетероциклическую группу, C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, линейную или разветвленную C₁-C₁₂-алкильную группу, необязательно замещенную одним или более аминами; или тканеспецифический или клеточеспецифический нацеливающий фрагмент.

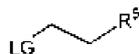
В предпочтительных вариантах осуществления амин-содержащее соединение представляет собой



В некоторых вариантах осуществления в соединении формулы А Y представляет собой -O- и Z представляет собой алкильную группу, циклоалкильную группу, алкенильную группу, циклоалкенильную группу, арильную группу, арилалкильную группу, гетероалкильную группу, гетероциклическую группу или их комбинацию, необязательно содержащую от 1 до 8 или от 2 до 8 вторичных или третичных аминов. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой арилалкильную группу, такую как бензил. Способ получения полимера формулы 5 дополнительно содержит, после осуществления полимеризации с раскрытием кольца, обработку полученного промежуточного полимера соединением формулы NHR¹⁷-A¹, где A¹ является таким, как определено в отношении формулы 1. Соединение формулы NHR¹⁷-A¹ необязательно представляет собой диэтиленамин триамин. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы NHR¹⁷-A¹ не является диэтиленамин триамином.

R¹⁷ может представлять собой водород или C₁-C₁₂-алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу. В некоторых вариантах осуществления R¹⁷ представляет собой линейную или разветвленную C₁-C₁₂-алкильную группу (например, C₁-C₁₀-алкильную группу; C₁-C₈-алкильную группу; C₁-C₆-алкильную группу; C₁-C₄-алкильную группу, C₁-C₃-алкильную группу или C₁ или C₂ алкильную группу). В некоторых вариантах осуществления R¹⁷ представляет собой метил. В других вариантах осуществления R¹⁷ может быть водородом. Обычно в заданном полимере все R¹⁷ являются одинаковыми (например, все представляет собой метил или водород); однако каждый R¹⁷ выбирают независимо, и R¹⁷ могут быть одинаковыми или разными.

Примеры соединений, содержащих уходящие группы, подходящие для применения, включают соединение формулы:



где LG представляет собой уходящую группу (например, хлорид, бромид, йодид, тозилат, трифлат, мезилат и т.д.);

R⁵ является таким, как описано в отношении любой из формул 1, 1.1, 1.2, 1A, 1.1A или 1.2A.

В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции замещения используют кислоту и/или основание. Кислота и/или основание могут быть любой кислотой и/или основанием с любым подходящим значением рКа. Кислота и/или основание могут быть органической кислотой (например, п-толуолсульфоновой кислотой), органическим основанием (например, триэтиламино), неоргани-

ческой кислотой (например, тетрахлоридом титана), неорганическим основанием (например, карбонатом калия) или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции замещения используют кислоту. Кислота может представлять собой кислоту Брэнстеда или кислоту Льюиса. В вариантах осуществления, в которых кислота представляет собой кислоту Брэнстеда, кислота может быть слабой кислотой (т.е. с рKa от примерно 4 до примерно 7) или сильной кислотой (т.е. с рKa от примерно -2 до примерно 4). Обычно кислота является слабой кислотой. В некоторых вариантах осуществления кислота представляет собой кислоту Льюиса. Например, кислота может представлять собой бис-(трифторметансульфон)имид или *p*-толуолсульфоновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления для облегчения проведения реакции замещения используют основание. Основание может представлять собой слабое основание (т.е. с рKa от примерно 7 до примерно 12) или сильное основание (т.е. с рKa от примерно 12 до примерно 50). Обычно основание представляет собой слабое основание. Например, основание может представлять собой триэтиламин, диизопропилэтиламин, пиридин, *N*-метил морфолин или *N*, *N*-диметилпиперазин или их производные.

В некоторых вариантах осуществления реакцию замещения выполняют в растворителе. Растворитель может быть любым подходящим растворителем или смесью растворителей, способных сольватировать полимер и соединение, содержащее уходящую группу, для прохождения реакции. Например, растворитель может включать воду, протонные органические растворители и/или апротонные органические растворители. Приведенный в качестве примера список растворителей включает воду, дихлорметан, диэтиловый эфир, диметилсульфоксид, ацетонитрил, метанол и этанол.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение полимера, содержащего структуру формулы 1. Полимер, содержащий структуру формулы 1, может быть выделен с помощью любых подходящих средств. Например, полимер, содержащий структуру формулы 1, может быть выделен путем экстракции, кристаллизации, рекристаллизации, колоночной хроматографии, фильтрации или любой их комбинацией.

Композиции

Представленные в настоящем описании полимеры можно использовать для любых целей. Однако считается, что полимеры особенно полезны для доставки нуклеиновых кислот и/или полипептидов (например, белка) в клетки. Таким образом, предложена композиция, содержащая раскрытые в настоящем описании полимер и нуклеиновую кислоту и/или полипептид (например, белок).

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нуклеиновую кислоту. Можно использовать любую нуклеиновую кислоту. Приведенный в качестве примера список нуклеиновых кислот включает системы CRISPR геновой и/или донорной нуклеиновых кислот, миРНК, микроРНК, интерферирующую РНК или РНКи, дцРНК, мРНК, ДНК-вектор, рибозимы, антисмысловые полинуклеотиды и ДНК-кассеты экспрессии, кодирующие миРНК, микроРНК, дцРНК, рибозимы или антисмысловые нуклеиновые кислоты. миРНК содержит двухцепочечную структуру, обычно содержащую 15-50 пар оснований и предпочтительно 19-25 пар оснований и имеющую нуклеотидную последовательность, идентичную или почти идентичную экспрессируемому целевому гену или РНК внутри клетки. миРНК может состоять из двух гибридных полинуклеотидов или одного полинуклеотида, который образует шпильчатую структуру. МикроРНК (миРНК) представляют собой малые некодирующие полинуклеотиды, длиной примерно 22 нуклеотида, которые направляют деградацию или трансляционную репрессию своих целевых мРНК. Антисмысловые полинуклеотиды содержат последовательность, комплементарную гену или мРНК. Антисмысловые полинуклеотиды включают, без ограничения, морфолины, 2'-*O*-метилполинуклеотиды, ДНК, РНК и т.п.

Ингибитор экспрессии на основе полинуклеотидов может быть полимеризованным *in vitro*, рекомбинантным, содержать химерные последовательности или производные этих групп. Ингибитор экспрессии на основе полинуклеотидов может содержать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, синтетические нуклеотиды или любую подходящую комбинацию, которая подавляет целевую РНК и/или ген. Полинуклеотид также может представлять собой последовательность, которая служит "штрих-кодом" для таких целей, как отслеживание доставки *in vitro* или *in vivo*.

Композиция также может содержать любой предназначенный для доставки белок в дополнение к нуклеиновой кислоте или вместо нее. Полипептид может быть любым подходящим полипептидом. Например, полипептид может быть цинк-пальцевой нуклеазой, эффекторной нуклеазой, подобной активатору транскрипции ("TALEN"), рекомбиназой, дезаминазой, эндонуклеазой или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой РНК-управляемую эндонуклеазу (например, полипептид Cas9, полипептид Cpf1 или их варианты) или ДНК-рекомбиназу (например, полипептид Cre).

Считается, что представленные в настоящем описании полимеры особенно полезны для доставки одного или более компонентов системы CRISPR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиция содержит геновую РНК, РНК-управляемую эндонуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую ее, и/или донорную нуклеиновую кислоту. Композиция может содержать один, два или все три компонента вместе с раскрытым в настоящем описании полимером. Кроме того, композиция может со-

держат несколько гидовых РНК, РНК-управляемых эндонуклеаз или нуклеиновых кислот, кодирующих их, и/или донорные нуклеиновые кислоты. Например, могут быть включены несколько различных гидовых РНК для разных целевых сайтов, необязательно с несколькими разными донорными нуклеиновыми кислотами и даже с несколькими разными РНК-управляемыми эндонуклеазами или нуклеиновыми кислотами, кодирующими их.

Кроме того, компоненты системы CRISPR можно комбинировать друг с другом (если присутствует несколько компонентов) и полимером любым конкретным способом или в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления гидовую РНК связывают в комплекс с РНК-эндонуклеазой до объединения с полимером. Дополнительно или альтернативно гидовая РНК может быть связана (ковалентно или нековалентно) с донорной нуклеиновой кислотой до объединения с полимером.

Композиции не ограничены какой-либо конкретной системой CRISPR (т.е. любой конкретной гидовой РНК, РНК-управляемой эндонуклеазой или донорной нуклеиновой кислотой), многие из которых известны. Тем не менее для дополнительной иллюстрации ниже описаны компоненты некоторых таких систем.

Донорная нуклеиновая кислота.

Донорная нуклеиновая кислота (или "донорная последовательность", или "донорный полинуклеотид", или "донорная ДНК") представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая предназначена для введения в сайт расщепления, индуцируемого РНК-направленной эндонуклеазой (например, полипептидом Cas9 или полипептидом Crf1). Донорный полинуклеотид может иметь достаточную гомологию с целевой геномной последовательностью в сайте расщепления, например 70, 80, 85, 90, 95 или 100% гомологию с нуклеотидными последовательностями, фланкирующими сайт расщепления, например, в пределах примерно 50 оснований или меньше от сайта расщепления, например, в пределах примерно 30 оснований, в пределах примерно 15 оснований, в пределах примерно 10 оснований, в пределах примерно 5 оснований от сайта расщепления или непосредственно фланкирующими сайт расщепления, для поддержания репарации, управляемой гомологией между ним и геномной последовательностью, которой он гомологичен. Гомология, составляющая приблизительно 25, 50, 100 или 200 нуклеотидов или более 200 нуклеотидов последовательности между донором и геномной последовательностью (или любое интегральное значение от 10 до 200 нуклеотидов или более) будут поддерживать управляемую гомологией репарацию. Донорные последовательности могут иметь любую длину, например 10 нуклеотидов или более, 50 нуклеотидов или более, 100 нуклеотидов или более, 250 нуклеотидов или более, 500 нуклеотидов или более, 1000 нуклеотидов или более, 5000 нуклеотидов или более и т.д.

Донорная последовательность обычно не идентична геномной последовательности, которую она заменяет. Скорее, донорная последовательность может содержать одну или более замен, вставок, делеций, инверсий или перестановок единичных оснований относительно геномной последовательности, пока сохраняется достаточная гомология для поддержания управляемой гомологией репарации. В некоторых вариантах осуществления донорная последовательность включает негомологичную последовательность, фланкированную двумя областями гомологии, вследствие чего в результате управляемой гомологией репарации между целевой областью ДНК и двумя фланкирующими последовательностями происходит вставка негомологичной последовательности в целевую область. Донорные последовательности также могут включать остов вектора, содержащий последовательности, которые не гомологичны представляющей интерес области ДНК и которые не предназначены для вставки в представляющую интерес область ДНК. Как правило, гомологичный(ые) участок(и) донорной последовательности будет иметь по меньшей мере 50% идентичности последовательности с геномной последовательностью, с которой желательна рекомбинация. В некоторых вариантах осуществления имеется 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 или 99,9% идентичности последовательности. Идентичность последовательности может иметь любое значение от 1 до 100% в зависимости от длины донорного полинуклеотида.

Донорной последовательность может отличаться до некоторой степени от геномной последовательности, например сайтами рестрикции, нуклеотидными полиморфизмами, селективируемыми маркерами (например, генами устойчивости к лекарственным веществам, флуоресцентными белками, ферментами и т.д.) и т.д., которые можно использовать для оценки успешности вставки донорной последовательности в сайт расщепления или которые в некоторых вариантах осуществления можно использовать для других целей (например, для обозначения экспрессии в целевом локусе генома). В некоторых вариантах осуществления, если такие различия нуклеотидных последовательностей находятся в кодирующей области, они не будут изменять аминокислотную последовательность или будут приводить к молчащим аминокислотным заменам (т.е. заменам, которые не влияют на структуру или функцию белка). Альтернативно, эти различия в последовательностях могут включать последовательности, фланкирующие рекомбинацию, такие как последовательности FLP, IoxP и т.п., которые могут быть активированы в более позднее время для удаления последовательности маркера.

Донорная последовательность может быть введена в клетку в виде одноцепочечной ДНК, одноцепочечной РНК, двухцепочечной ДНК или двухцепочечной РНК. Она может быть введена в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности могут быть защищены (например, от экзонуклеолитической дегградации) способами, известными специали-

стам в данной области. Например, к 3'-концу линейной молекулы добавляют один или более дидезокси-нуклеотидных остатков, и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируют с одним или обоими концами. См., например, Chang et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4959-4963; Nehls et al. (1996), Science, 272:886-889. Также могут быть успешно использованы процедуры амплификации, такие как амплификация по типу катящегося кольца, как показано в настоящем описании. Дополнительные методы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают, помимо прочего, добавление концевой(ых) аминокислот(ы) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфоритиаты, фосфорамидаты и остатки O-метилрибозы или дезоксирибозы.

В качестве альтернативы, для защиты концов линейной донорной последовательности за пределами областей гомологии могут быть включены дополнительные последовательности определенной длины, которые могут быть разрушены без воздействия на рекомбинацию. Донорную последовательность можно ввести в клетку в составе молекулы вектора, содержащей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Более того, донорные последовательности могут быть введены в виде голой нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с агентом, таким как липосома или полимер, или могут быть доставлены вирусами (например, аденовирусом, AAV), как раскрыто в настоящем описании для нуклеиновых кислот, кодирующих геновую РНК Cas9 и/или слитый полипептид Cas9 и/или донорный полинуклеотид.

Гидовая нуклеиновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит гидовую нуклеиновую кислоту. Гидовые нуклеиновые кислоты, подходящие для включения в композицию по настоящему изобретению, включают одномолекулярные гидовые РНК ("одинарная гидовая РНК"/"огРНК") и двухмолекулярные гидовые нуклеиновые кислоты ("двойная гидовая РНК"/"дгРНК").

Гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК), подходящая для включения в комплекс по настоящему изобретению, направляет активность РНК-управляемой эндонуклеазы (например, полипептида Cas9 или Cpf1) на конкретную целевую последовательность в целевой нуклеиновой кислоте. Гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) содержит первый сегмент (также называемый в настоящем описании "нацеливающим сегментом нуклеиновой кислоты" или просто "нацеливающим сегментом") и второй сегмент (также называемый в настоящем описании "белок-связывающим сегментом"). Термины "первый" и "второй" не подразумевают порядок, в котором сегменты встречаются в гидовой РНК. Порядок элементов относительно друг друга зависит от конкретного используемого РНК-управляемого полипептида. Например, гидовая РНК для Cas9 обычно имеет белок-связывающий сегмент, расположенный на 3'-конце нацеливающего сегмента, тогда как гидовая РНК для Cpf1 обычно имеет белок-связывающий сегмент, расположенный на 5'-конце нацеливающего сегмента.

Гидовая РНК может быть введена в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы гидовой РНК могут быть защищены (например, от экзонуклеолитической деградации) методами, известными специалистам в данной области. Процедуры амплификации, такие как амплификация по типу катящегося кольца, также могут быть успешно использованы, как проиллюстрировано в настоящем описании.

Первый сегмент: нацеливающий сегмент.

Первый сегмент гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) включает нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности (целевому сайту) целевой нуклеиновой кислоты. Другими словами, нацеливающий сегмент гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) может взаимодействовать с целевой нуклеиновой кислотой (например, РНК, ДНК, двухцепочечной ДНК) специфическим для последовательности образом путем гибридизации (т.е. спаривания оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность нацеливающего сегмента может меняться и может определять местоположение в целевой нуклеиновой кислоте, в котором будут взаимодействовать гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) и целевая нуклеиновая кислота. Нацеливающий сегмент гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) может быть модифицирован (например, методами генной инженерии) для гибридизации с любой требуемой последовательностью (целевым сайтом) в целевой нуклеиновой кислоте.

Нацеливающий сегмент может иметь длину от 12 до 100 нуклеотидов. Нуклеотидная последовательность (нацеливающая последовательность, также называемая гидовой последовательностью) нацеливающего сегмента, который является комплементарным нуклеотидной последовательности (целевому сайту) целевой нуклеиновой кислоты, может иметь длину 12 нуклеотидов (нт) или более. Например, нацеливающая последовательность нацеливающего сегмента, который является комплементарным целевому сайту целевой нуклеиновой кислоты, может иметь длину 12 нт или более, 15 нт или более, 17 нт или более, 18 нт или более, 19 нт или более, 20 нт или более, 25 нт или более, 30 нт или более, 35 нт или более или 40 нт.

Процент комплементарности между нацеливающей последовательностью (т.е. гидовой последовательностью) нацеливающего сегмента и целевым сайтом целевой нуклеиновой кислоты может составлять 60% или более (например, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более или 100%). В неко-

торых вариантах осуществления процент комплементарности между нацеливающей последовательностью нацеливающего сегмента и целевым сайтом целевой нуклеиновой кислоты составляет 100% в пределах семи смежных ближайших к 5'-концу нуклеотидов целевого сайта целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления процент комплементарности между нацеливающей последовательностью нацеливающего сегмента и целевым сайтом целевой нуклеиновой кислоты составляет 60% или более в пределах 20 смежных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления процент комплементарности между нацеливающей последовательностью нацеливающего сегмента и целевым сайтом целевой нуклеиновой кислоты составляет 100% в пределах 17, 18, 19 или 20 смежных ближайших к 5'-концевых нуклеотидов целевого сайта целевой нуклеиновой кислоты и 0% или более в остальной части. В таком случае можно считать, что нацеливающая последовательность имеет длину 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов соответственно.

Второй сегмент: белок-связывающий сегмент.

Белок-связывающий сегмент гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) взаимодействует (связывается) с РНК-управляемой эндонуклеазой. Гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) направляет связанную эндонуклеазу на определенную нуклеотидную последовательность в целевой нуклеиновой кислоте (целевом сайте) посредством вышеупомянутого нацеливающего сегмента/нацеливающей последовательности/гидовой последовательности. Белок-связывающий сегмент гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) содержит два участка нуклеотидов, комплементарных друг другу. Комплементарные нуклеотиды белок-связывающего сегмента гибридизуются с образованием дуплекса двухцепочечной РНК (дцРНК).

Одинарные и двойные гидовые нуклеиновые кислоты.

Двойная гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) состоит из двух отдельных молекул нуклеиновой кислоты. Каждая из двух молекул рассматриваемой двойной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) содержит участок нуклеотидов, комплементарных друг другу, такой, что комплементарные нуклеотиды двух молекул гибридизуются с образованием дуплекса двухцепочечной РНК белок-связывающего сегмента.

В некоторых вариантах осуществления дуплекс-образующий сегмент активатора является на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% или более идентичным или на 100% идентичным одной из молекул активатора (тракрРНК, tracrRNA), приведенных в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или его комплементу на участке, состоящем из 8 или более смежных нуклеотидов (например, 8 или более смежных нуклеотидов, 10 или более смежных нуклеотидов, 12 или более смежных нуклеотидов, 15 или более смежных нуклеотидов или 20 или более смежных нуклеотидов).

В некоторых вариантах осуществления дуплекс-образующий сегмент таргетера (targeter) является на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% или более идентичным или на 100% идентичным одной из целевых последовательностей (крРНК, crRNA), приведенных в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или ее комплементу на участке, состоящем из 8 или более смежных нуклеотидов (например, 8 или более смежных нуклеотидов, 10 или более смежных нуклеотидов, 12 или более смежных нуклеотидов, 15 или более смежных нуклеотидов или 20 или более смежных нуклеотидов).

Двойная гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) может быть разработана для обеспечения контролируемого (т.е. зависящего от условий) связывания таргетера с активатором. Поскольку двойная гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) не работает, если активатор и таргетер не связаны в функциональный комплекс с Cas9, двойная гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) может быть индуцируемой (например, индуцируемой лекарственным веществом), генерируя индуцируемую связь между активатором и таргетером. В качестве одного неограничивающего примера для регулирования (т.е. управления) связывания активатора с таргетером могут использоваться РНК-аптамеры. Соответственно, активатор и/или таргетер могут включать последовательность аптамера РНК.

Аптамеры (например, аптамеры РНК) известны в данной области и обычно представляют собой синтетическую версию рибопереклочателя. Термины "РНК-аптамер" и "рибопереклочатель" используются в настоящем описании взаимозаменяемо, охватывая как синтетические, так и природные последовательности нуклеиновых кислот, которые обеспечивают индуцируемую регуляцию структуры (и, следовательно, доступность конкретных последовательностей) молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК, гибрида ДНК/РНК и т.д.), частью которого они являются. РНК-аптамеры обычно содержат последовательность, которая складывается в определенную структуру (например, шпильку), которая специфически связывается с конкретным лекарственным веществом (например, малой молекулой). Связывание лекарственного вещества вызывает структурное изменение в укладке РНК, что изменяет свойства нуклеиновой кислоты, частью которой является аптамер. В качестве неограничивающих примеров (i) активатор с аптамером неспособен связываться с родственным таргетером, если аптамер не связан соответствующим лекарственным веществом; (ii) таргетер с аптамером неспособен связываться с родственным активатором, если аптамер не связан соответствующим лекарственным веществом; и (iii) таргетер и активатор, каждый из которых содержит разные аптамеры, связывающие разные лекарственные вещества,

неспособны связываться друг с другом, если не присутствуют оба лекарственных вещества. Как показано в этих примерах, двойная гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) может быть сконструирована таким образом, чтобы она была индуцируемой.

Примеры аптамеров и рибопереключателей можно найти, например, в: Nakamura et al., *Genes Cells*. 2012 May; 17(5):344-64; Vavalle et al., *Future Cardiol*. 2012 May; 8(3):371-82; Citartan et al., *Biosens Bioelectron*. 2012 Apr 15; 34(1):1-11; and Liberman et al., *Wiley Interdiscip Rev. RNA*. 2012 May-Jun; 3(3):369-84; все включены в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки.

Неограничивающие примеры нуклеотидных последовательностей, которые могут быть включены в двойную гидовую нуклеиновую кислоту (например, гидовую РНК), представлены в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, а также включают их комплементы, которые могут гибридизоваться с образованием белок-связывающего сегмента.

Рассматриваемая одинарная гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) содержит два участка нуклеотидов (подобно "таргетеру" и "активатору" двойной гидовой нуклеиновой кислоты), которые комплементарны друг другу, гибридизуются с образованием дуплекса двухцепочечной РНК (дуплекса дцРНК) белок-связывающего сегмента (что приводит к образованию структуры стержень-петля) и ковалентно связываются посредством промежуточных нуклеотидов ("линкерных" или "линкерных нуклеотидов"). Таким образом, рассматриваемая одинарная гидовая нуклеиновая кислота (например, одинарная гидовая РНК) может содержать таргетер и активатор, каждый из которых имеет дуплекс-образующий сегмент, где дуплекс-образующие сегменты таргетера и активатора гибридизуются друг с другом с образованием дуплекса дцРНК. Таргетер и активатор могут быть ковалентно связаны через 3'-конец таргетера и 5'-конец активатора. Альтернативно, таргетер и активатор могут быть ковалентно связаны через 5'-конец таргетера и 3'-конец активатора.

Линкер одинарной гидовой нуклеиновой кислоты может иметь длину от 3 до 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления линкер одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) составляет 4 нуклеотида.

Типичная одинарная гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) содержит два комплементарных участка нуклеотидов, которые гибридизуются с образованием дуплекса дцРНК. В некоторых вариантах осуществления один из двух комплементарных участков нуклеотидов одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) (или ДНК, кодирующей этот участок) является на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% или более идентичным или на 100% идентичным одной из молекул активатора (тракрРНК), приведенных в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или его комплементу, в пределах участка, состоящего из 8 или более смежных нуклеотидов (например, 8 или более смежных нуклеотидов, 10 или более смежных нуклеотидов, 12 или более смежных нуклеотидов, 15 или более смежных нуклеотидов или 20 или более смежных нуклеотидов).

В некоторых вариантах осуществления один из двух комплементарных участков нуклеотидов одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) (или ДНК, кодирующей этот участок) является на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% или более идентичным или на 100% идентичным одной из целевых последовательностей (крРНК), приведенных в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или его комплементу, в пределах участка, состоящего из 8 или более смежных нуклеотидов (например, 8 или более смежных нуклеотидов, 10 или более смежных нуклеотидов, 12 или более смежных нуклеотидов, 15 или более смежных нуклеотидов или 20 или более смежных нуклеотидов).

В некоторых вариантах осуществления один из двух комплементарных участков нуклеотидов одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) (или ДНК, кодирующей этот участок) является на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% или более идентичным или на 100% идентичным одной из последовательностей таргетера (крРНК) или последовательностей активатора (тракрРНК), приведенных в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или их комплементу, в пределах участка, состоящего из 8 или более смежных нуклеотидов (например, 8 или более смежных нуклеотидов, 10 или более смежных нуклеотидов, 12 или более смежных нуклеотидов, 15 или более смежных нуклеотидов или 20 или более смежных нуклеотидов).

Соответствующие родственные пары таргетеров и активаторов могут быть определены с помощью рутинных процедур, принимая во внимание название вида и спаривание оснований (для дуплекса дцРНК белок-связывающего домена). В составе двойной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) или в составе одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) может использоваться любая пара активатор/таргетер.

В некоторых вариантах осуществления активатор (например, трРНК, трРНК-подобная молекула и т.д.) двойной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) (например, двойной гидовой РНК) или одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, гидовой РНК) (например, одинарной гидовой РНК) включает участок нуклеотидов с 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или более или 100% идентичности последовательности с молекулой активатора (тракрРНК), описанной в международных заявках на патента № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или его комплементом.

В некоторых вариантах осуществления активатор (например, трРНК, трРНК-подобная молекула и

т.д.) двойной гидовой нуклеиновой кислоты (например, двойной гидовой РНК) или одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, одинарной гидовой РНК) включает 30 или более нуклеотидов (nt) (например, 40 или более, 50 или более, 60 или более, 70 или более, 75 или более нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления активатор (например, трРНК, трРНК-подобная молекула и т.д.) двойной гидовой нуклеиновой кислоты (например, двойной гидовой РНК) или одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, одинарной гидовой РНК) имеет длину в диапазоне от 30 до 200 нуклеотидов (nt).

Белок-связывающий сегмент может иметь длину от 10 до 100 нуклеотидов.

Также в отношении как рассматриваемой одинарной гидовой нуклеиновой кислоты (например, одинарной гидовой РНК), так и рассматриваемой двойной гидовой нуклеиновой кислоты (например, двойной гидовой РНК), дуплекс дцРНК белок-связывающего сегмента может иметь длину от 6 до 50 пар оснований (п.о.). Процент комплементарности между нуклеотидными последовательностями, которые гибридизуются с образованием дуплекса дцРНК белок-связывающего сегмента, может составлять 60% или более. Например, процент комплементарности между нуклеотидными последовательностями, которые гибридизуются с образованием дуплекса дцРНК белок-связывающего сегмента, может составлять 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 98% или более или 99% или более (например, в некоторых вариантах осуществления присутствуют некоторые нуклеотиды, которые не гибридизуются и, следовательно, создают выпуклость внутри дуплекса дцРНК). В некоторых вариантах осуществления процент комплементарности между нуклеотидными последовательностями, которые гибридизуются с образованием дуплекса дцРНК белок-связывающего сегмента, составляет 100%.

Гибридные гидовые нуклеиновые кислоты.

В некоторых вариантах осуществления гидовая нуклеиновая кислота представляет собой две молекулы РНК (двойная гидовая РНК). В некоторых вариантах осуществления гидовая нуклеиновая кислота представляет собой одну молекулу РНК (одинарная гидовая РНК). В некоторых вариантах осуществления гидовая нуклеиновая кислота представляет собой ДНК/РНК гибридную молекулу. В таких вариантах осуществления белок-связывающий сегмент гидовой нуклеиновой кислоты представляет собой РНК и образует дуплекс РНК. Таким образом, дуплекс-образующие сегменты активатора и таргетера представляют собой РНК. Однако нацеливающий сегмент гидовой нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК. Таким образом, если ДНК/РНК гибридная гидовая нуклеиновая кислота представляет собой двойную гидовую нуклеиновую кислоту, молекула "таргетера" и является гибридной молекулой (например, нацеливающий сегмент может быть ДНК, а образующий дуплекс сегмент может быть РНК). В таких вариантах осуществления дуплекс-образующий сегмент молекулы "активатора" может представлять собой РНК (например, для образования РНК-дуплекса с дуплекс-образующим сегментом целевой молекулы), в то время как нуклеотиды молекулы "активатора", которые находятся за пределами дуплекс-образующего сегмента, могут быть ДНК (в этом случае молекула активатора представляет собой гибридную ДНК/РНК молекулу) или могут быть РНК (в этом случае молекулой активатора является РНК). Если ДНК/РНК гибридная гидовая нуклеиновая кислота представляет собой одинарную гидовую нуклеиновую кислоту, то нацеливающий сегмент может быть ДНК, дуплекс-образующие сегменты (которые составляют белок-связывающий сегмент одинарной гидовой нуклеиновой кислоты) могут быть РНК, и нуклеотиды за пределами нацеливающего и дуплекс-образующего сегментов могут быть РНК или ДНК.

В некоторых вариантах осуществления может быть использована ДНК/РНК гибридная гидовая нуклеиновая кислота, например, когда целевая нуклеиновая кислота представляет собой РНК. Cas9 обычно связывается с гидовой РНК, которая гибридизуется с целевой ДНК, таким образом образуя дуплекс ДНК-РНК в целевом сайте. Следовательно, когда целевая нуклеиновая кислота представляет собой РНК, иногда выгодно воспроизвести дуплекс ДНК-РНК в целевом сайте, используя нацеливающий сегмент (гидовой нуклеиновой кислоты), который представляет собой ДНК, а не РНК. Однако, поскольку белок-связывающий сегмент гидовой нуклеиновой кислоты представляет собой РНК-дуплекс, в нацеливаемом сегменте таргетерной молекулой является ДНК, а в дуплекс-образующем сегменте - РНК. Гибридные гидовые нуклеиновые кислоты могут смещать связывание Cas9 в сторону связывания с одноцепочечными целевыми нуклеиновыми кислотами в сравнении с двухцепочечными целевыми нуклеиновыми кислотами.

Примеры гидовых нуклеиновых кислот.

Можно использовать любую гидовую нуклеиновую кислоту. В данной области известно много различных типов гидовых нуклеиновых кислот. Выбранная гидовая нуклеиновая кислота может быть соответствующим образом спарена с конкретной используемой системой CRISPR (например, с конкретной используемой РНК-управляемой эндонуклеазой). Таким образом, гидовая нуклеиновая кислота может быть, например, гидовой нуклеиновой кислотой, соответствующей любой РНК-управляемой эндонуклеазе, раскрытой в настоящем описании или известной в данной области. Гидовые нуклеиновые кислоты и РНК-управляемые эндонуклеазы описаны, например, в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617.

В некоторых вариантах осуществления подходящая гидовая нуклеиновая кислота включает две отдельные молекулы РНК-полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первая из двух от-

дельных молекул РНК-полинуклеотидов (активатор) содержит нуклеотидную последовательность, имеющую 60% или более (например, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 98% или более, 99% или более или 100%) идентичности нуклеотидной последовательности в пределах участка, состоящего из 8 или более смежных нуклеотидов (например, 8 или более смежных нуклеотидов, 10 или более смежных нуклеотидов, 12 или более смежных нуклеотидов, 15 или более смежных нуклеотидов или 20 или более смежных нуклеотидов), с любой из нуклеотидных последовательностей, раскрытых в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или ее комплементом. В некоторых вариантах осуществления вторая из двух отдельных молекул полинуклеотидов РНК (таргетер) содержит нуклеотидную последовательность, имеющую 60% или более (например, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 98% или более, 99% или более или 100%) идентичности нуклеотидной последовательности в пределах участка, состоящего из 8 или более смежных нуклеотидов (например, 8 или более смежных нуклеотидов, 10 или более смежных нуклеотидов, 12 или более смежных нуклеотидов, 15 или более смежных нуклеотидов или 20 или более смежных нуклеотидов), с любой из нуклеотидных последовательностей, раскрытых в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или ее комплементом.

В некоторых вариантах осуществления подходящая гидовая нуклеиновая кислота представляет собой полинуклеотид единичной РНК и содержит первую и вторую нуклеотидную последовательности, имеющие 60% или более (например, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 98% или более, 99% или более или 100%) идентичности нуклеотидной последовательности в пределах участка, состоящего из 8 или более смежных нуклеотидов (например, 8 или более смежных нуклеотидов, 10 или более смежных нуклеотидов, 12 или более смежных нуклеотидов, 15 или более смежных нуклеотидов или 20 или более смежных нуклеотидов), с любой из нуклеотидных последовательностей, приведенных в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617, или ее комплементом.

В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК представляет собой гидовую РНК Cpf1 и/или Cas9. Гидовая РНК Cpf1 и/или Cas9 может иметь общую длину от 30 нуклеотидов (нт) до 100 нт, например, от 30 до 40 нт, от 40 до 45 нт, от 45 до 50 нт, от 50 до 60 нт, от 60 до 70 нт, от 70 до 80 нт, от 80 до 90 нт или от 90 до 100 нт. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК Cpf1 и/или Cas9 имеет общую длину 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нт. Гидовая РНК Cpf1 и/или Cas9 может включать сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, и дуплекс-образующий сегмент.

Сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, гидовой РНК Cpf1 и/или Cas9 может иметь длину от 15 до 30 нт, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 нуклеотидов, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нт. В некоторых вариантах осуществления сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, имеет длину 23 нт. В некоторых вариантах осуществления сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, имеет длину 24 нт. В некоторых вариантах осуществления сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, имеет длину 25 нт.

Сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, гидовой РНК Cpf1 и/или Cas9 может иметь 100% комплементарности с соответствующей длиной последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Нацеливающий сегмент может иметь менее 100% комплементарности с соответствующей длиной последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Например, сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, гидовой РНК Cpf1 и/или Cas9 может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов, которые не комплементарны последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления, в которых сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, имеет длину 25 нуклеотидов, и последовательность целевой нуклеиновой кислоты имеет длину 25 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, имеет 100% комплементарности с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты. В качестве другого примера, в некоторых вариантах осуществления, в которых сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, имеет длину 25 нуклеотидов, и последовательность целевой нуклеиновой кислоты имеет длину 25 нуклеотидов, в некоторых вариантах осуществления сегмент, связывающий целевую нуклеиновую кислоту, имеет один некомплементарный нуклеотид и 24 комплементарных нуклеотида с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты.

Дуплекс-образующий сегмент гидовой РНК Cpf1 и/или Cas9 может иметь длину от 15 до 25 нт, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нт.

В некоторых вариантах осуществления дуплекс-образующий сегмент гидовой РНК Cpf1 может содержать нуклеотидную последовательность 5'-AAUUUCUACUGUUGUAGAU-3'.

Дополнительные элементы.

В некоторых вариантах осуществления гидовая нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК) включает дополнительный сегмент или сегменты (в некоторых вариантах осуществления на 5'-конце, в некоторых вариантах осуществления на 3'-конце, в некоторых вариантах осуществления либо на 5'-, либо на 3'-конце, в некоторых вариантах осуществления встроенные в последовательность (т.е. не на 5'- и/или

3'-конце), в некоторых вариантах осуществления как на 5'-конце, так и на 3'-конце, в некоторых вариантах осуществления встроенные и на 5'-конце и/или 3'-конце и т.д.). Например, подходящий дополнительный сегмент может включать 5'-кэп (например, 7-метилгуанилатный кэп (m7G)); 3'-полиаденилированный хвост (т.е. 3'-поли(A) хвост); последовательность рибозима (например, для обеспечения саморасщепления гидовой нуклеиновой кислоты или компонента гидовой нуклеиновой кислоты, например, таргетера, активатора и т.д.); последовательность рибопереклювателя (например, для обеспечения регулируемой стабильности и/или регулируемой доступности для белков и белковых комплексов); последовательность, которая образует дуплекс дцРНК (т.е. шпильку)); последовательность, которая нацелена на РНК в субклеточном участке (например, ядре, митохондриях, хлоропластах и т.п.); модификацию или последовательность, которая обеспечивает отслеживание (например, метку, такую как флуоресцентная молекула (т.е. флуоресцентный краситель), последовательность или другой фрагмент, который облегчает обнаружение флуоресценции; последовательность или другую модификацию, которая обеспечивает сайт связывания для белков (например, белков, которые действуют на ДНК, включая активаторы транскрипции, репрессоры транскрипции, ДНК-метилтрансферазы, ДНК-деметиلاзы, гистоновые ацетилтрансферазы, гистоновые деацетилазы, белки, связывающие РНК (например, аптамеры РНК), меченые белки, флуоресцентно меченые белки и т.п.); модификацию или последовательность, которая обеспечивает повышенную, пониженную и/или контролируемую стабильность, и их комбинации.

РНК-управляемая эндонуклеаза.

Композиция может содержать, дополнительно или вместо гидовой нуклеиновой кислоты, белок РНК-управляемой эндонуклеазы или кодирующую его нуклеиновую кислоту (например, мРНК или вектор). Может использоваться любая РНК-управляемая эндонуклеаза. Выбор используемой РНК-управляемой эндонуклеазы будет зависеть, по меньшей мере частично, от предполагаемого конечного использования применяемой системы CRISPR.

В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой полипептид Cas9. Полипептиды Cas9, подходящие для включения в композицию по настоящему изобретению, включают встречающийся в природе полипептид Cas9 (например, встречающийся в природе в бактериальных и/или архейных клетках) или не встречающийся в природе полипептид Cas9 (например, полипептид Cas9 представляет собой вариант полипептида Cas9, химерный полипептид, как обсуждается ниже, и т.п.), как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области может оценить, что раскрытый в настоящем описании полипептид Cas9 может быть любым вариантом, полученным или выделенным из любого источника. В других вариантах осуществления пептид Cas9 по настоящему изобретению может включать одну или более мутаций, описанных в литературе, включая, без ограничения, функциональные мутации, описанные в Fonfara et al. *Nucleic Acids Res.* 2014 Feb; 42(4):2577-90; Nishimasu H. et al. *Cell.* 2014 Feb 27; 156(5):935-49; Jinek M. et al. *Science.* 2012, 337:816-21; и Jinek M. et al. *Science.* 2014 Mar 14; 343(6176); см. также заявку на патент США № 13/842,859, поданную 15 марта 2013 г., которая включена в настоящее описание посредством ссылки; также см. патенты США № 8,697,359; 8,771,945; 8,795,965; 8,865,406; 8,871,445; 8,889,356; 8,895,308; 8,906,616; 8,932,814; 8,945,839; 8,993,233 и 8,999,641, включенные в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления системы и способы, раскрытые в настоящем описании, можно использовать с белком Cas9 дикого типа, обладающим активностью двухцепочечной нуклеазы, мутантами Cas9, которые действуют как одноцепочечные никазы, или другими мутантами с модифицированной нуклеазной активностью. Таким образом, полипептид Cas9, подходящий для включения в композицию по настоящему изобретению, может быть ферментативно активным полипептидом Cas9, например, может давать одно- или двухцепочечные разрывы в целевой нуклеиновой кислоте или, альтернативно, может иметь пониженную ферментативную активность по сравнению с полипептидом Cas9 дикого типа.

Встречающиеся в природе полипептиды Cas9 связываются с гидовой нуклеиновой кислотой, тем самым направляя ее на конкретную последовательность в целевой нуклеиновой кислоте (целевой сайт) и расщепляют целевую нуклеиновую кислоту (расщепляют дцДНК, создавая двухцепочечный разрыв, расщепляют оцРНК, расщепляют оцРНК и т.д.). Рассматриваемый полипептид Cas9 включает две части: РНК-связывающую часть и часть с активностью. РНК-связывающая часть взаимодействует с рассматриваемой нуклеиновой кислотой, и часть с активностью обладает сайт-направленной ферментативной активностью (например, нуклеазную активность, активность метилирования ДНК и/или РНК, активность расщепления ДНК и/или РНК, активность ацетилирования гистонов, активность метилирования гистонов, активность модификации РНК, РНК-связывающую активность, активность сплайсинга РНК и т.д.). В некоторых вариантах осуществления часть с активностью имеет пониженную нуклеазную активность по сравнению с соответствующей частью полипептида Cas9 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления часть с активностью ферментативно неактивна.

Анализ для определения, имеет ли белок РНК-связывающую часть, которая взаимодействует с рассматриваемой нуклеиновой кислотой, могут представлять собой любой удобный анализ связывания, позволяющий оценить связывание между белком и нуклеиновой кислотой. Типичные анализы связывания включают анализы связывания (например, анализы сдвига электрофоретической подвижности в геле), которые включают добавление гидовой нуклеиновой кислоты и полипептида Cas9 к целевой нук-

леиновой кислоте.

Анализы для определения, имеет ли белок часть с активностью (например, чтобы определить, обладает ли полипептид нуклеазной активностью, которая расщепляет целевую нуклеиновую кислоту), могут представлять собой любой удобный анализ расщепления нуклеиновой кислоты, позволяющий оценить расщепление нуклеиновой кислоты. Типичные анализы расщепления включают добавление гидовой нуклеиновой кислоты и полипептида Cas9 к целевой нуклеиновой кислоте.

В некоторых вариантах осуществления подходящий полипептид Cas9 для включения в композицию по настоящему изобретению имеет ферментативную активность, которая модифицирует целевую нуклеиновую кислоту (например, нуклеазную активность, активность метилтрансферазы, активность деметилазы, активность репарации ДНК, активность повреждения ДНК, активность дезаминирования, активность дисмутазы, активность алкилирования, активность депуринизации, активность окисления, активность образования димера пиримидина, активность интегразы, активность транспозазы, активность рекомбиназы, активность полимеразы, активность лигазы, активность геликазы, активность фотолиазы или активность гликозилазы).

В других вариантах осуществления полипептид Cas9, подходящий для включения в композицию по настоящему изобретению, имеет ферментативную активность, которая модифицирует полипептид (например, гистон), связанный с целевой нуклеиновой кислотой (например, активностью метилтрансферазы, активностью деметилазы, активностью ацетилтрансферазы, активностью деацетилазы, активностью киназы, активностью фосфатазы, активностью убиквитинлигазы, активностью деубиквитинирования, активностью аденилирования, активностью деаденилирования, активностью SUMO-лирования, активностью де-SUMO-лирования, активностью рибозилирования, активностью дерибозилирования, активностью миристоилирования или активностью демиристоилирования).

Было идентифицировано множество ортологов Cas9, происходящих из широкого разнообразия видов, и в некоторых вариантах осуществления белки имеют только несколько идентичных аминокислот. Все идентифицированные ортологи Cas9 имеют одинаковую доменную архитектуру с центральным эндонуклеазным доменом HNH и доменом расщепления RuvC/RNaseH. Белки Cas9 имеют четыре общих ключевых мотива с консервативной архитектурой. Мотивы 1, 2 и 4 представляют собой RuvC-подобные мотивы, тогда как мотив 3 представляет собой HNH-мотив.

В некоторых вариантах осуществления подходящий полипептид Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 4 мотива, каждый из мотивов 1-4 имеет 60% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 99% или более или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью Cas9, изображенной на фиг. 1 (SEQ ID NO: 1); или, альтернативно, с мотивами 1-4 аминокислотной последовательности Cas9, представленной в табл. 1 ниже (мотивы 1-4 SEQ ID NO: 1 представляют собой SEQ ID NO: 3-6 соответственно, как показано в табл. 1 ниже); или, альтернативно, с аминокислотами 7-166 или 731-1003 аминокислотной последовательности Cas9, изображенной на фиг. 1 (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более или 98% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 1 и приведенной в SEQ ID NO: 1; и включает аминокислотные замены N497, R661, Q695 и Q926 относительно аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную замену K855 относительно аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотные замены K810, K1003 и R1060 относительно аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотные замены K848, K1003 и R1060 относительно аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1.

Используемый в настоящем описании термин "полипептид Cas9" включает термин "вариант полипептида Cas9"; и термин "вариант полипептида Cas9" включает термин "химерный полипептид Cas9".

Варианты полипептида Cas9.

Полипептиды Cas9, подходящие для включения в композицию по настоящему изобретению, включают вариант полипептида Cas9. Вариант полипептида Cas9 имеет аминокислотную последовательность, которая отличается одной аминокислотой (например, имеет делецию, вставку, замену, слияние) (т.е. отличается по меньшей мере одной аминокислотой) по сравнению с аминокислотной последовательностью полипептида Cas9 дикого типа (например, встречающегося в природе полипептид Cas9, как описано выше). В некоторых случаях вариант полипептида Cas9 имеет аминокислотную замену (например, делецию, вставку или замену), которая снижает нуклеазную активность полипептида Cas9. Например, в некоторых случаях вариант полипептида Cas9 содержит менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% нуклеазной активности, проявляемой соответствующим полипептидом Cas9 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 не обладает значительной нуклеазной активностью. Когда полипептид Cas9 представляет собой вариант полипептида Cas9, который не обладает значительной нуклеазной активностью, он может быть указан как "dCas9".

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 имеет пониженную нуклеазную активность. Например, вариант полипептида Cas9, подходящий для использования в способе связывания

по настоящему изобретению, имеет менее примерно 20%, менее примерно 15%, менее примерно 10%, менее примерно 5%, менее примерно 1% или менее примерно 0,1% эндонуклеазной активности, проявляемой полипептидом Cas9 дикого типа, например полипептида Cas9 дикого типа, содержащего аминокислотную последовательность, показанную на фиг. 1 (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 может расщеплять комплементарную цепь целевой нуклеиновой кислоты, но имеет пониженную способность расщеплять некомплементарную цепь двухцепочечной целевой нуклеиновой кислоты. Например, вариант полипептида Cas9 может иметь мутацию (аминокислотную замену), которая снижает функцию домена RuvC (например, "домена 1" на фиг. 1). В качестве неограничивающего примера, в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 имеет мутацию D10A (например, замену аспартата аланином в положении аминокислоты, соответствующем положению 10 SEQ ID NO: 1) и поэтому может расщеплять комплементарную цепь двухцепочечной целевой нуклеиновой кислоты, но имеет пониженную способность расщеплять некомплементарную цепь двухцепочечной целевой нуклеиновой кислоты (что приводит к разрыву одной цепи (SSB) вместо разрыва двух цепей (DSB), когда вариант полипептида Cas9 расщепляет целевую двухцепочечную нуклеиновую кислоту) (см., например, Jinek et al., *Science*. 2012 Aug 17; 337(6096):816-21).

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 может расщеплять некомплементарную цепь двухцепочечной целевой нуклеиновой кислоты, но имеет пониженную способность расщеплять комплементарную цепь целевой нуклеиновой кислоты. Например, вариант полипептида Cas9 может иметь мутацию (аминокислотную замену), которая снижает функцию домена HNH (мотивы домена RuvC/HNH/RuvC, "домен 2" на фиг. 1). В качестве неограничивающего примера в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 может иметь мутацию H840A (например, замену гистидина аланином в положении аминокислоты, соответствующем положению 840 SEQ ID NO: 1) (фиг. 1) и, следовательно, может расщеплять некомплементарную цепь целевой нуклеиновой кислоты, но имеет пониженную способность расщеплять комплементарную цепь целевой нуклеиновой кислоты (что приводит к SSB вместо DSB, когда вариант полипептида Cas9 расщепляет двухцепочечную целевую нуклеиновую кислоту). Такой полипептид Cas9 имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту (например, одноцепочечную целевую нуклеиновую кислоту), но сохраняет способность связывать целевую нуклеиновую кислоту (например, одноцепочечную или двухцепочечную целевую нуклеиновую кислоту).

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 имеет пониженную способность расщеплять как комплементарные, так и некомплементарные цепи двухцепочечной целевой нуклеиновой кислоты. В качестве неограничивающего примера в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 содержит мутации как D10A, так и H840A (например, мутацию как в домене RuvC, так и в домене HNH), в результате чего полипептид имеет пониженную способность расщеплять обе комплементарную и некомплементарную цепи двухцепочечной целевой нуклеиновой кислоты. Такой полипептид Cas9 имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту (например, одноцепочечную целевую нуклеиновую кислоту или двухцепочечную целевую нуклеиновую кислоту), но сохраняет способность связывать целевую нуклеиновую кислоту (например, одноцепочечную целевую нуклеиновую кислоту или двухцепочечную целевую нуклеиновую кислоту).

В качестве другого неограничивающего примера в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 содержит мутации W476A и W1126A, вследствие чего полипептид имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. Такой полипептид Cas9 имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту, но сохраняет способность связывать целевую нуклеиновую кислоту.

В качестве другого неограничивающего примера в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 содержит мутации P475A, W476A, N477A, D1125A, W1126A и D1127A, вследствие чего полипептид имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. Такой полипептид Cas9 имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту, но сохраняет способность связывать целевую нуклеиновую кислоту.

В качестве другого неограничивающего примера в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 содержит мутации H840A, W476A и W1126A, вследствие чего полипептид имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. Такой полипептид Cas9 имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту, но сохраняет способность связывать целевую нуклеиновую кислоту.

В качестве другого неограничивающего примера в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 содержит мутации H840A, D10A, W476A и W1126A, вследствие чего полипептид имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. Такой полипептид Cas9 имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту, но сохраняет способность связывать целевую нуклеиновую кислоту.

В качестве другого неограничивающего примера в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 содержит мутации H840A, P475A, W476A, N477A, D1125A, W1126A и D1127A,

вследствие чего полипептид имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. Такой полипептид Cas9 имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту, но сохраняет способность связывать целевую нуклеиновую кислоту.

В качестве другого неограничивающего примера в некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 содержит мутации D10A, H840A, P475A, W476A, N477A, D1125A, W1126A и D1127A, вследствие чего полипептид имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. Такой полипептид Cas9 имеет пониженную способность расщеплять целевую нуклеиновую кислоту, но сохраняет способность связывать целевую нуклеиновую кислоту.

Для достижения вышеуказанных эффектов (т.е. инактивации той или иной части нуклеазы) можно подвергнуть модификации и другие остатки. В качестве неограничивающих примеров остатки D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986 и/или A987 могут быть изменены (т.е. заменены) (см. табл. 1 для получения дополнительной информации относительно сохранения аминокислотных остатков Cas9). Подходящими также являются мутации, отличные от замены аланина.

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9, который обладает пониженной каталитической активностью (например, когда белок Cas9 имеет D10, G12, G17, E762, H840, N854, N863, H982, H983, A984, D986 и/или мутацию A987, например D10A, G12A, G17A, E762A, H840A, N854A, N863A, H982A, H983A A984A и/или D986A), вариант полипептида Cas9 все еще может связываться с целевой нуклеиновой кислотой сайт-специфическим образом (потому что он все еще нацелен на последовательность целевой нуклеиновой кислоты посредством гидовой нуклеиновой кислоты) до тех пор, пока у него сохраняется способность взаимодействовать с гидовой нуклеиновой кислотой.

В табл. 1 перечислены четыре мотива, которые присутствуют в последовательностях Cas9 различных видов. Перечисленные в этой таблице аминокислоты получены из Cas9 *S. pyogenes* (SEQ ID NO: 1).

Таблица 1

| Мотив | Мотив | Аминокислоты (№ остатка(ов)) | Сильно консервативные |
|-------|-----------|---|---------------------------------|
| 1 | RuvC | IGLDIGTNSVGVAVI (7-21) (SEQ ID NO:3) | D10, G12, G17 |
| 2 | RuvC | IVIEMARE (759-766) (SEQ ID NO:4) | E762 |
| 3 | HNH-motif | DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS DKN (837-863) (SEQ ID NO:5) | H840, N854, N863 |
| 4 | RuvC | HNHNDAYL (982-989) (SEQ ID NO:6) | H982, H983, A984, D986, A987 |

В дополнение к вышеуказанному вариант белка Cas9 может иметь такие же параметры идентичности последовательности, как описано выше для полипептидов Cas9. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления подходящий вариант полипептида Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 4 мотива, причем каждый из мотивов 1-4 имеет 60% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 99% или более или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью Cas9, изображенной на фиг. 1 (SEQ ID NO: 1), или, альтернативно, с мотивами 1-4 (мотивы 1-4 SEQ ID NO: 1 представляют собой SEQ ID NO: 3-6 соответственно, как показано в табл. 1); или, альтернативно, с аминокислотами 7-166 или 731-1003 аминокислотной последовательности Cas9, изображенной на фиг. 1 (SEQ ID NO: 1). Любой определенный выше белок Cas9 может быть использован в качестве полипептида Cas9 или в качестве части химерного полипептида Cas9 в композиции по настоящему изобретению, включая полипептиды, которые, в частности, приведены в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617.

В некоторых вариантах осуществления подходящий вариант полипептида Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 99% или более или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью Cas9, изображенной на фиг. 1 (SEQ ID NO: 1). Любой белок Cas9, определенный выше, может быть использован в качестве варианта полипептида Cas9 или в качестве части химерного варианта полипептида Cas9 в композиции по настоящему раскрытию, включая, в частности, полипептиды, приведенные в международных заявках на патент № PCT/US2016/052690 и PCT/US2017/062617.

Химерные полипептиды (слитые полипептиды).

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида Cas9 представляет собой химерный полипептид Cas9 (также упоминаемый в настоящем описании как слитый полипептид, например, "слитый полипептид Cas9"). Слитый полипептид Cas9 может связывать и/или модифицировать целевую нуклеиновую кислоту (например, расщеплять, метилировать, деметилировать и т.д.) и/или полипептид, ас-

социированный с целевой нуклеиновой кислотой (например, метилирование, ацетилирование и т.д., например, гистоновый хвост).

Слитый полипептид Cas9 представляет собой вариант полипептида Cas9 в силу того, что последовательность отличается от полипептида Cas9 дикого типа (например, встречающегося в природе полипептида Cas9). Слитый полипептид Cas9 представляет собой полипептид Cas9 (например, полипептид Cas9 дикого типа, вариант полипептида Cas9, вариант полипептида Cas9 со сниженной нуклеазной активностью (как описано выше) и т.п.), слитый с ковалентно связанным гетерологичным полипептидом (также называемым "партнером по слиянию"). В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид Cas9 представляет собой вариант полипептида Cas9 с пониженной нуклеазной активностью (например, dCas9), слитый с ковалентно связанным гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид проявляет (и, следовательно, обеспечивает) активность (например, ферментативную активность), которую также можно наблюдать у слитого полипептида Cas9 (например, активность метилтрансферазы, активность ацетилтрансферазы, активность киназы, активность убиквитинирования и т.д.). В некоторых таких вариантах осуществления способ связывания, например, когда полипептид Cas9 представляет собой вариант полипептида Cas9, имеющий партнера по слиянию (т.е. имеющий гетерологичный полипептид) с активностью (например, ферментативной активностью), которая модифицирует целевую нуклеиновую кислоту, этот метод также можно рассматривать как метод модификации целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления способ связывания целевой нуклеиновой кислоты (например, одноцепочечной целевой нуклеиновой кислоты) может привести к модификации целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ связывания целевой нуклеиновой кислоты (например, одноцепочечной целевой нуклеиновой кислоты) может представлять собой способ модификации целевой нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность может иметь субклеточную локализацию, т.е. гетерологичная последовательность представляет собой последовательность субклеточной локализации (например, сигнал ядерной локализации (NLS) для нацеливания на ядро, последовательность, которая удерживает слитый белок вне ядра, например последовательность экспорта из ядра (NES), последовательность для удерживания слитого белка в цитоплазме, сигнал митохондриальной локализации для нацеливания на митохондрии, сигнал локализации хлоропласта для нацеливания на хлоропласт, сигнал удерживания в эндоплазматическом ретикулуме (ER) и т.п.). В некоторых вариантах осуществления вариант Cas9 не включает NLS, следовательно, белок не нацелен на ядро (что может обеспечить преимущество, например, когда целевая нуклеиновая кислота представляет собой РНК, присутствующую в цитозоле). В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность может предоставлять метку (т.е. гетерологичная последовательность представляет собой детектируемую метку) для простоты отслеживания и/или очистки (например, флуоресцентный белок, например зеленый флуоресцентный белок (GFP), YFP, RFP, CFP, mCherry, tdTomato и т.п.; гистидиновый тег, например тег 6XHis; тег гемагглютинина (HA); тег FLAG; тег Мус и т.п.). В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность может обеспечивать повышенную или пониженную стабильность (т.е. гетерологичная последовательность представляет собой пептид контроля стабильности, например дегрон, который в некоторых вариантах осуществления является контролируемым (например, термочувствительная последовательность дегрона или последовательность дегрона, контролируемая лекарственным веществом, см. ниже). В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность может обеспечивать повышенную или пониженную транскрипцию из целевой нуклеиновой кислоты (т.е. гетерологичная последовательность представляет собой последовательность модуляции транскрипции, например, фактор/активатор транскрипции или его фрагмент, белок или его фрагмент, который рекрутирует фактор/активатор транскрипции, репрессор транскрипции или его фрагмент, белок или его фрагмент, который рекрутирует репрессор транскрипции, малую молекулу/регулятор транскрипции, чувствительный к лекарственному веществу, и т.д.). В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность может обеспечивать связывающий домен (т.е. гетерологичная последовательность представляет собой последовательность связывающего белка, например, для обеспечения способности слитого полипептида Cas9 связываться с другим представляющим интерес белком, например белком, модифицирующим ДНК или гистон, фактором транскрипции или репрессором транскрипции, рекрутирующим белком, ферментом модификации РНК, РНК-связывающим белком, фактором инициации трансляции, фактором сплайсинга РНК и др.). Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты может быть связана с другой последовательностью нуклеиновой кислоты (например, методом геной инженерии) для создания химерной нуклеотидной последовательности, кодирующей химерный полипептид.

Рассматриваемый слитый полипептид Cas9 (слитый белок Cas9) может иметь несколько (1 или более, 2 или более, 3 или более и т.д.) партнеров по слиянию в любой комбинации из вышеперечисленного. В качестве иллюстративного примера слитый белок Cas9 может иметь гетерологичную последовательность, которая обеспечивает активность (например, модуляции транскрипции, модификации мишени, модификации белка, связанного с целевой нуклеиновой кислотой, и т.д.), а также может иметь последовательность субклеточной локализации. В некоторых вариантах осуществления такой слитый белок Cas9 также может иметь метку для облегчения отслеживания и/или очистки (например, зеленый флуоресцент-

ный белок (GFP), YFP, RFP, CFP, mCherry, tdTomato и т.п.; гистидиновую метку, например тег 6XHis; тег гемагглютинина (HA); тег FLAG; тег Мус и т.п.). В качестве другого иллюстративного примера белок Cas9 может иметь один или более NLS (например, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, 1, 2, 3, 4 или 5 NLS). В некоторых вариантах осуществления партнер по слиянию (или несколько партнеров по слиянию) (например, NLS, метка, партнер по слиянию, обеспечивающий активность, и т.д.) расположен на С-конце Cas9 или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления партнер по слиянию (или несколько партнеров по слиянию) (например, NLS, метка, партнер по слиянию, обеспечивающий активность, и т.д.) расположен на N-конце Cas9. В некоторых вариантах осуществления Cas9 имеет партнера по слиянию (или нескольких партнеров по слиянию) (например, NLS, метку, партнера по слиянию, обеспечивающего активность, и т.д.) как на N-конце, так и на С-конце.

Подходящие партнеры по слиянию, которые обеспечивают повышенную или пониженную стабильность, включают, без ограничения, последовательности дегрона. Специалисты в данной области легко поймут, что дегроны представляют собой аминокислотные последовательности, которые контролируют стабильность белка, частью которого они являются. Например, стабильность белка, содержащего последовательность дегрона, частично контролируется последовательностью дегрона. В некоторых вариантах осуществления подходящий дегрон является конститутивным, благодаря чему дегрон оказывает свое влияние на стабильность белка независимо от экспериментального контроля (т.е. дегрон не индуцируется лекарственным веществом, не индуцируется температурой и т.д.). В некоторых вариантах осуществления дегрон обеспечивает вариант полипептида Cas9 с контролируемой стабильностью, такой, что вариант полипептида Cas9 может быть включен (т.е. быть стабильным) или "выключен" (т.е. быть нестабильным, деградированным) в зависимости от требуемых условий. Например, если дегрон является термочувствительным дегроном, вариант полипептида Cas9 может быть функциональным (т.е. "включенным", стабильным) ниже пороговой температуры (например, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30°C и т.д.), но нефункциональным (т.е. "выключенным", деградированным) выше пороговой температуры. В качестве другого примера, если дегрон является дегроном, индуцируемым лекарственным веществом, присутствие или отсутствие лекарственного вещества может переключать белок из "выключенного" (т.е. нестабильного) состояния во "включенное" (т.е. стабильное) состояние, или наоборот. Типичный индуцируемый лекарственным веществом дегрон происходит из белка FKBP12. Стабильность дегрона контролируется наличием или отсутствием малой молекулы, которая связывается с дегроном.

Примеры подходящих дегронов включают, без ограничения, дегроны, которые контролируются Shield-1, DHFR, ауксинами и/или температурой. Неограничивающие примеры подходящих дегронов известны в данной области (см., например, Dohmen et al., *Science*, 1994. 263(5151):1273-1276: Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants; Schoeber et al., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2009 Jan; 296(1):F204-11: Conditional fast expression and function of multimeric TRPV5 channels using Shield-1; Chu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008 Nov 15; 18(22):5941-4: Recent progress with FKBP-derived destabilizing domains; Kanemaki, *Pflugers Arch.* 2012 Dec 28: *Frontiers of protein expression control with conditional degrons*; Yang et al., *Mol. Cell.* 2012 Nov 30; 48(4):487-8: Titivated for destruction: the methyl degron; Barbour et al., *Biosci Rep.* 2013 Jan 18; 33(1): Characterization of the bipartite degron that regulates ubiquitin-independent degradation of thymidylate synthase; и Greussing et al., *J. Vis. Exp.* 2012 Nov 10; (69): Monitoring of ubiquitin-proteasome activity in living cells using a Degron (dgn)-destabilized green fluorescent protein (GFP)-based reporter protein; все включены в настоящее описание в качестве ссылки).

Типичные последовательности дегрона хорошо охарактеризованы и протестированы как на клетках, так и на животных. Таким образом, слитый белок Cas9 (например, Cas9 дикого типа; вариант Cas9; вариант Cas9 со сниженной нуклеазной активностью, например dCas9 и т.п.) с последовательностью дегрона дает "настраиваемый" и "индуцируемый" полипептид Cas9. Любой из раскрытых в настоящем описании партнеров по слиянию можно использовать в любой требуемой комбинации. В качестве одного из неограничивающих иллюстративных примеров слитый белок Cas9 (т.е. химерный полипептид Cas9) может содержать последовательность YFP для облегчения обнаружения, последовательность дегрона для обеспечения стабильности и последовательность активатора транскрипции для увеличения транскрипции целевой нуклеиновой кислоты. Подходящий репортерный белок для использования в качестве партнера по слиянию для полипептида Cas9 (например, Cas9 дикого типа, варианта Cas9, варианта Cas9 с пониженной функцией нуклеаз и т.д.) включает, без ограничения, следующие типичные белки (или их функциональные фрагменты): his3, β -галактозидазу, флуоресцентный белок (например, GFP, RFP, YFP, cherry, tomato и т.д. и их различные производные), люциферазу, β -глюкуронидазу и щелочную фосфатазу. Кроме того, количество партнеров по слиянию, которые можно использовать в слитом белке Cas9, неограниченно. В некоторых вариантах осуществления слитый белок Cas9 содержит одну или более (например, две или более, три или более, четыре или более или пять или более) гетерологичных последовательностей.

Подходящие партнеры по слиянию включают, без ограничения, полипептид, который обеспечивает активность метилтрансферазы, деметилазы, ацетилтрансферазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, убиквитинлигазы, деубиквитинирования, аденилирования, деаденилирования, SUMO-лирования, де-SUMO-

лирования, рибозилирования, дерибозилирования, миристоилирования или демиростоилирования, любая из которых может быть направлена непосредственно на модификацию нуклеиновой кислоты (метилование ДНК или РНК) или на модификацию полипептида, ассоциированного с нуклеиновой кислотой (например, гистона, ДНК-связывающего белка и РНК-связывающего белка и т.п.). Дополнительные подходящие партнеры по слиянию включают, помимо прочего, граничные элементы (например, CTCF), белки и их фрагменты, которые обеспечивают рекрутирование на периферии (например, ламин А, ламин В и т.д.) и стыкующий белок элементы (например, FKBP/FRB, Pll1/Aby1 и т.д.).

Примеры различных дополнительных подходящих партнеров по слиянию (или их фрагментов) для рассматриваемого варианта полипептида Cas9 включают, без ограничения, партнеров, описанных в заявках на патент PCT: WO 2010/075303, WO 2012/068627 и WO 2013/155555, которые включены в настоящее описание ссылкой во всей своей полноте.

Подходящие партнеры по слиянию включают, без ограничения, полипептид, который обеспечивает активность, опосредованно увеличивающую транскрипцию, через воздействие непосредственно на целевую нуклеиновую кислоту или на полипептид (например, гистон, ДНК-связывающий белок, РНК-связывающий белок, белок редактирования РНК и т.д.), ассоциированный с целевой нуклеиновой кислотой. Подходящие партнеры по слиянию включают, без ограничения, полипептид, обеспечивающий активность метилтрансферазы, деметилазы, ацетилтрансферазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, убиквитинлигазы, деубиквитинирования, аденилирования, деаденилирования, SUMO-лирования, де-SUMO-лирования, рибозилирования, дерибозилирования, миристоилирования или демиростоилирования.

Дополнительные подходящие партнеры по слиянию включают, без ограничения, полипептид, который непосредственно обеспечивает повышенную транскрипцию и/или трансляцию целевой нуклеиновой кислоты (например, активатор транскрипции или его фрагмент, белок или его фрагмент, который рекрутирует активатор транскрипции, малую молекулу/регулятор транскрипции и/или трансляции, чувствительный к лекарственному веществу, белок, регулирующий трансляцию, и т.д.).

Неограничивающие примеры партнеров по слиянию для достижения повышенной или пониженной транскрипции включают домены активатора транскрипции и репрессора транскрипции (например, ассоциированный с Krüppel бокс (KRAB или SKD); домен взаимодействия Mad mSIN3 (SID); репрессорный домен ERF (ERD) и т.д.). В некоторых таких вариантах осуществления нацеливание слитого белка Cas9 на конкретное место (т.е. последовательность) в целевой нуклеиновой кислоте осуществляется с помощью гидовой нуклеиновой кислоты, в котором он осуществляет locus-специфическую регуляцию, такую как блокирование связывания РНК-полимеразы с промотором (который избирательно ингибирует функцию активатора транскрипции) и/или модифицирует локальный статус хроматина (например, когда используется слитая последовательность, которая модифицирует целевую нуклеиновую кислоту или модифицирует полипептид, связанный с целевой нуклеиновой кислотой). В некоторых вариантах осуществления изменения являются временными (например, репрессия или активация транскрипции). В некоторых вариантах осуществления изменения являются наследственными (например, когда эпигенетические модификации происходят в целевой нуклеиновой кислоте или в белках, связанных с целевой нуклеиновой кислотой, например нуклеосомных гистонах).

Неограничивающие примеры партнеров по слиянию для использования при нацеливании на целевые нуклеиновые кислоты оцРНК включают (без ограничения): факторы сплайсинга (например, домены RS); компоненты трансляции белков (например, факторы инициации трансляции, элонгации и/или высвобождения; например, eIF4G); РНК-метилазы; ферменты редактирования РНК (например, РНК дезаминазы, например аденозиндезаминазы, действующей на РНК (ADAR), включая ферменты редактирования А на I и/или С на U); зависящие от геликазы варианты осуществления; РНК-связывающие белки и т.п. Понятно, что партнер по слиянию может включать весь белок или в некоторых вариантах осуществления может включать фрагмент белка (например, функциональный домен).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность может быть слита с С-концом полипептида Cas9. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность может быть слита с N-концом полипептида Cas9. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная последовательность может быть слита с внутренней частью (т.е. частью, отличной от N- или С-конца) полипептида Cas9.

Кроме того, партнером по слиянию химерного полипептида Cas9 может быть любой домен, способный взаимодействовать с оцРНК (которая применительно к настоящему изобретению включает внутримолекулярные и/или межмолекулярные вторичные структуры, например дуплексы двухцепочечной РНК, такие как шпильки, стержени-петли и т.д.), временно или необратимо, непосредственно или опосредованно, включая, без ограничения, эффекторный домен, выбранный из группы, включающей эндонуклеазы (например, РНКазу I, домен CRR22 DYW, Dicer и домены PEST (N-конец PUT) из белков, таких как SMG5 и SMG6); белки и белковые домены, ответственные за стимуляцию расщепления РНК (например, CPSF, CstF, CFI и CFIIm); экзонуклеазы (например, XRN-1 или экзонуклеаза T); деаденилазы (например, HNT3); белки и белковые домены, ответственные за нонсенс-опосредованный распад РНК (например, UPF1, UPF2, UPF3, UPF3b, РНП S1, Y14, DEK, REF2 и SRm160); белки и белковые домены, ответственные за стабилизацию РНК (например, PABP); белки и белковые домены, ответственные за

репрессию трансляции (например, Ago2 и Ago4); белки и белковые домены, ответственные за стимуляцию трансляции (например, Staufен); белки и белковые домены, ответственные за (например, способные) модуляцию трансляции (например, факторы трансляции, такие как факторы инициации, факторы элонгации, факторы высвобождения и т.д., например, eIF4G); белки и белковые домены, ответственные за полиаденилирование РНК (например, PAP1, GLD-2 и Star-PAP); белки и белковые домены, ответственные за полиуридинилирование РНК (например, CID1 и терминальная уридилаттрансфераза); белки и белковые домены, ответственные за локализацию РНК (например, из IMP1, ZBP1, She2p, She3p и Vcaudal-D); белки и белковые домены, ответственные за удержание РНК в ядре (например, Rgp6); белки и белковые домены, ответственные за экспорт РНК в ядро (например, TAP, NXF1, THO, TREX, REF и Aly); белки и белковые домены, ответственные за репрессию сплайсинга РНК (например, PTB, Sam68 и hnRNP A1); белки и белковые домены, ответственные за стимуляцию сплайсинга РНК (например, домены, богатые серином/аргинином (SR)); белки и белковые домены, ответственные за снижение эффективности транскрипции (например, FUS (TLS)); и белки и белковые домены, ответственные за стимуляцию транскрипции (например, CDK7 и HIV Tat). Альтернативно, эффекторный домен может быть выбран из группы, включающей эндонуклеазы; белки и белковые домены, способные стимулировать расщепление РНК; экзонуклеазы; деаденилазы; белки и белковые домены, обладающие активностью нонсенс-опосредованного распада РНК; белки и белковые домены, способные стабилизировать РНК; белки и белковые домены, способные репрессировать трансляцию; белки и белковые домены, способные стимулировать трансляцию; белки и белковые домены, способные модулировать трансляцию (например, факторы трансляции, такие как факторы инициации, факторы элонгации, факторы высвобождения и т.д., например eIF4G); белки и белковые домены, способные к полиаденилированию РНК; белки и белковые домены, способные к полиуридинилированию РНК; белки и белковые домены, обладающие активностью по локализации РНК; белки и белковые домены, способные удерживать РНК в ядре; белки и белковые домены, обладающие активностью экспорта РНК в ядро; белки и белковые домены, способные подавлять сплайсинг РНК; белки и белковые домены, способные стимулировать сплайсинг РНК; белки и белковые домены, способные снижать эффективность транскрипции; и белки и белковые домены, способные стимулировать транскрипцию. Другим подходящим партнером по слиянию является РНК-связывающий домен PUF, который более подробно описан в WO 2012/068627.

Некоторые факторы сплайсинга РНК, которые можно использовать (целиком или в виде фрагментов) в качестве партнеров по слиянию для полипептида Cas9, имеют модульную организацию из отдельных модулей, связывающих специфические последовательности РНК, и эффекторных доменов, ответственных за сплайсинг. Например, члены семейства белков, богатых серином/аргинином (SR), содержат мотивы распознавания N-концевой РНК (RRM), которые связываются с энхансерами экзонного сплайсинга (ESE) в пре-мРНК и C-концевых доменах RS, которые способствуют включению экзонов. В качестве другого примера белок hnRNP A1 связывается с экзонными сайленсерами сплайсинга (ESS) через свои RRM-домены и ингибирует включение экзона через C-концевой домен, богатый глицином. Некоторые факторы сплайсинга могут регулировать альтернативное использование сайта сплайсинга (ss) путем связывания с регуляторными последовательностями между двумя альтернативными сайтами. Например, ASF/SF2 может распознавать ESE и способствовать использованию проксимальных участков интрона, тогда как hnRNP A1 может связываться с ESS и сдвигать сплайсинг в сторону использования дистальных участков интрона. Одним из применений таких факторов является создание ESE, которые модулируют альтернативный сплайсинг эндогенных генов, особенно генов, ассоциированных с заболеванием. Например, пре-мРНК Vcl-x продуцирует две изоформы сплайсинга с двумя альтернативными 5'-сайтами сплайсинга для кодирования белков с противоположными функциями. Длинная изоформа сплайсинга Vcl-xL является мощным ингибитором апоптоза, экспрессируемым в долгоживущих постмитотических клетках, и активируется во многих раковых клетках, защищая клетки от сигналов апоптоза. Короткая изоформа Vcl-xS является проапоптотической изоформой и экспрессируется с высокой активностью в клетках с высокой скоростью обновления (например, развивающихся лимфоцитах). Соотношение двух изоформ сплайсинга Vcl-x регулируется множеством cis-элементов, которые расположены либо в коровой области экзона, либо в области удлинения экзона (т.е. между двумя альтернативными 5'-сайтами сплайсинга). Дополнительные примеры см. в WO 2010/075303.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas9 (например, Cas9 дикого типа, вариант Cas9, вариант Cas9 с пониженной нуклеазной активностью и т.д.) может быть связан с партнером по слиянию через пептидный спейсер.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas9 содержит "домен трансдукции белка" или РТД (также известный как CPP - проникающий в клетку пептид), который может относиться к полипептиду, полинуклеотиду, углеводу или органическому или неорганическому соединению, облегчающему прохождение липидного бислоя, мицеллы, клеточной мембраны, мембраны органеллы или мембраны везикул. Присоединенный к другой молекуле РТД, который может варьировать от малой полярной молекулы до большой макромолекулы и/или наночастицы, облегчает пересечение молекулы через мембрану, например переход из внеклеточного пространства во внутриклеточное пространство или из цитозоля в органеллу. В некоторых вариантах осуществления РТД, присоединенный к другой молекуле, облегчает

проникновение молекулы в ядро (например, в некоторых вариантах осуществления PTD включает сигнал ядерной локализации (NLS)). В некоторых вариантах осуществления полипептид Cas9 содержит два или более NLS, например два или более NLS в тандеме. В некоторых вариантах осуществления PTD ковалентно связан с аминоконцом полипептида Cas9. В некоторых вариантах осуществления PTD ковалентно связан с карбоксильным концом полипептида Cas9. В некоторых вариантах осуществления PTD ковалентно связан с аминоконцом и с карбоксильным концом полипептида Cas9. В некоторых вариантах осуществления PTD ковалентно связан с нуклеиновой кислотой (например, гидовой нуклеиновой кислотой, полинуклеотидом, кодирующим гидовую нуклеиновую кислоту, полинуклеотидом, кодирующим полипептид Cas9, и т.д.). Типичные PTD включают, без ограничения, минимальный ундекапептидный домен трансдукции белка (соответствующий остаткам 47-57 ТАТ ВИЧ-1, содержащего YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 7); последовательность полиаргинина, содержащую количество аргининов, достаточное для непосредственного проникновения в клетку (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 10-50 аргининов); домен VP22 (Zender et al. (2002), *Cancer Gene Ther.* 9(6):489-96); домен трансдукции белка *Drosophila Antennapedia* (Noguchi et al. (2003), *Diabetes*, 52(7):1732-1737); усеченный пептид человеческого кальцитонина (Trehin et al. (2004), *Pharm. Research*, 21:1248-1256); полилизин (Wender et al. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:13003-13008); RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO: 8); транспортан GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 9); KALAWKAKLAKALAKHLACALAKALKCEA (SEQ ID NO: 10); и RQIKIWQNRMMKWK (SEQ ID NO: 11). Примеры PTD включают, без ограничения, YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 12), RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 13); гомополимер аргинина, содержащий от 3 до 50 остатков аргинина; типичные аминокислотные последовательности домена PTD включают, без ограничения, любую из следующих: YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 14); RKKRRQRR (SEQ ID NO: 15); YARAAARQARA (SEQ ID NO: 16); THRLPRRRRRR (SEQ ID NO: 17) и GRRARRRRRR (SEQ ID NO: 18).

В некоторых вариантах осуществления PTD представляет собой активируемый CPP (ACPP) (Aguilera et al. (2009), *Integr. Biol. (Camb)* June; 1 (5-6):371-381). ACPP содержат поликатионный CPP (например, Arg9 или "R9"), связанный через расщепляемый линкер с подходящим полианионом (например, Glu9 или "E9"), что снижает общий заряд почти до нуля и тем самым подавляет адгезию и захват клетками. После расщепления линкера полианион высвобождается, локально демаскируя полиаргинин и принося ему адгезивность, таким образом "активируя" ACPP для прохождения через мембрану.

В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать РНК-управляемую эндонуклеазу Cpf1, пример которой представлен на фиг. 2, 16 или 17. Другое название РНК-управляемой эндонуклеазы Cpf1 - Cas12a. Системы Cpf1 CRISPR по настоящему раскрытию содержат i) единственный белок с эндонуклеазной активностью и ii) крРНК, в которой часть 3'-конца содержит гидовую последовательность, комплементарную целевой нуклеиновой кислоте. В этой системе нуклеаза Cpf1 рекрутируется непосредственно в целевую ДНК посредством крРНК. В некоторых вариантах осуществления гидовые последовательности для Cpf1 должны составлять по меньшей мере 12, 13, 14, 15 или 16 для детектируемого расщепления ДНК и минимум 14, 15, 16, 17 или 18 нт для эффективного расщепления ДНК.

Системы Cpf1 по настоящему изобретению отличаются от Cas9 по многим аспектам. Во-первых, в отличие от Cas9, Cpf1 не требуется отдельная тракрРНК для расщепления. В некоторых вариантах осуществления крРНК Cpf1 могут иметь длину примерно 42-44 оснований, из которых 23-25 нуклеотидов являются гидовой последовательностью и 19 нуклеотидов являются конститутивной последовательностью прямого повтора. Напротив, объединенные синтетические последовательности тракрРНК и крРНК Cas9 могут иметь длину примерно 100 оснований.

Во-вторых, предпочтительным мотивом Cpf1 является "TTN" PAM, расположенный на 5'-конце выше своей мишени. Это отличается от мотивов "NGG" PAM, расположенных на 3'-конце целевой ДНК системы Cas9. В некоторых вариантах осуществления основание урацила, непосредственно предшествующее гидовой последовательности, является замещаемым (Zetsche, B. et al. 2015. "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", *Cell*, 163, 759-771, полностью включенная в настоящее описание посредством ссылки для всех целей).

В-третьих, участки разрезания для Cpf1 смещены примерно на 3-5 оснований, что создает "липкие концы" (Kim et al., 2016. "Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells", опубликована онлайн в июне, 2016). Считается, что эти липкие концы с выступами из 3-5 п.н. способствуют лигированию, опосредованному NHEJ, и улучшают редактирование генов фрагментов ДНК с совпадающими концами. Участки разрезания находятся на 3'-конце целевой ДНК, дистальнее 5'-конца, где находится PAM. Положения разрезов обычно расположены ниже 18-го основания на негибридизованной цепи и соответствующего 23-го основания на комплементарной цепи, гибридизованной с крРНК.

В-четвертых, в комплексах Cpf1 "затравочная" область расположена в пределах первых 5 нуклеотидов гидовой последовательности. Затравочные области крРНК Cpf1 очень чувствительны к мутациям, и даже замены отдельных оснований в этой области могут резко снизить активность расщепления (см. Zetsche B. et al. 2015, "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System") *Cell*, 163, 759-771). Особо следует отметить тот факт, что в отличие от мишени CRISPR Cas9, сайты расщепления и затравочная область систем Cpf1 не перекрываются. Дополнительное руководство по созданию олиго-

нуклеотидов, нацеленных на крРНК Cpf1, доступно на (Zetsche B. et al. 2015. "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", Cell, 163, 759-771).

Специалисты в данной области поймут, что раскрытый в настоящем описании Cpf1 может быть любым вариантом, полученным или выделенным из любого источника, многие из которых известны в данной области. Например, в некоторых вариантах осуществления пептид Cpf1 по настоящему изобретению может включать FnCPF1 (например, SEQ ID NO: 2), представленный на фиг. 2, AsCpf1 (например, фиг. 16), LbCpf1 (например, фиг. 17) или любой другой из многих известных белков Cpf1 из различных других видов микроорганизмов и их синтетические варианты.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит полипептид Cpf1. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 является ферментативно активным, например полипептид Cpf1, когда он связан с гидовой РНК, расщепляет целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 проявляет пониженную ферментативную активность по сравнению с полипептидом Cpf1 дикого типа (например, по сравнению с полипептидом Cpf1, содержащим аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2, 16 или 17), и сохраняет активность связывания ДНК.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 включает аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с непрерывным участком, содержащим от 100 до 200 аминокислот (aa), от 200 до 400 aa, от 400 до 600 aa, от 600 до 800 aa, от 800 до 1000 aa, от 1000 до 1100 aa, от 1100 до 1200 aa или от 1200 до 1300 aa, аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 2, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с доменом RuvCI полипептида Cpf1 с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с доменом RuvCII полипептида Cpf1 с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с доменом RuvCIII полипептида Cpf1 с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 проявляет пониженную ферментативную активность по сравнению с полипептидом Cpf1 дикого типа (например, по сравнению с полипептидом Cpf1, содержащим аминокислотную последовательность, изображенную на фиг. 2, 16 или 17), и сохраняет активность связывания ДНК. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2, 16 или 17; и включает аминокислотную замену (например, замену D → A) в аминокислотном остатке, соответствующем аминокислоте 917 аминокислотной после-

довательности, изображенной на фиг. 2, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Crpf1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2, 16 или 17; и включает аминокислотную замену (например, замену E → A) в аминокислотном остатке, соответствующем аминокислоте 1006 аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 2, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Crpf1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, изображенной на фиг. 2, 16 или 17; и включает аминокислотную замену (например, замену D → A) в аминокислотном остатке, соответствующем аминокислоте 1255 аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 2, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Crpf1 представляет собой слитый полипептид, например, слитый полипептид Crpf1 содержащий а) полипептид Crpf1; и б) гетерологичный партнер по слиянию. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный партнер по слиянию слит с N-концом полипептида Crpf1. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный партнер по слиянию слит с C-концом полипептида Crpf1. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный партнер по слиянию слит как с N-концом, так и с C-концом полипептида Crpf1. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный партнер по слиянию вставлен внутри полипептида Crpf1.

Подходящие гетерологичные партнеры по слиянию включают NLS, эпитопные метки, флуоресцентные полипептиды и т.п.

Связанная гидовая РНК и донорная нуклеиновая кислота.

В одном из аспектов изобретение относится к комплексу, содержащему систему CRISPR, содержащую РНК-управляемую эндонуклеазу (например, полипептид Cas9 или Crpf1), гидовую РНК и донорный полинуклеотид, где гидовая РНК и донорный полинуклеотид связаны. Как показано в настоящем описании, гидовая РНК и донорный полинуклеотид могут быть связаны либо ковалентно, либо нековалентно. В одном из вариантов осуществления гидовая РНК и донорный полинуклеотид химически лигированы. В другом варианте осуществления гидовая РНК и донорный полинуклеотид ферментативно лигированы. В одном из вариантов осуществления гидовая РНК и донорный полинуклеотид гибридизуются друг с другом. В другом варианте осуществления и гидовая РНК, и донорный полинуклеотид гибридизуются через мостиковую последовательность. Возможно любое количество таких схем гибридизации.

Дезаминаза.

В некоторых вариантах осуществления комплекс или композиция дополнительно содержит дезаминазу (например, редактор основания аденина). Используемый в настоящем описании термин "дезаминаза" или "дезаминазный домен" относится к ферменту, который катализирует удаление аминогруппы из молекулы или дезаминирование. В некоторых вариантах осуществления дезаминаза представляет собой цитидин-дезаминазу, катализирующую гидролитическое дезаминирование цитидина или дезоксицитидина до уридина или дезоксиуридина, соответственно. В некоторых вариантах осуществления дезаминаза представляет собой цитозиндезаминазу, катализирующую гидролитическое дезаминирование цитозина до урацила (например, в РНК) или тимина (например, в ДНК).

В некоторых вариантах осуществления дезаминаза представляет собой аденозиндезаминазу, которая катализирует гидролитическое дезаминирование аденина или аденозина. В некоторых вариантах осуществления дезаминаза или домен дезаминазы представляет собой аденозиндезаминазу, катализирующую гидролитическое дезаминирование аденозина или дезоксиаденозина до инозина или дезоксиинозина, соответственно. В некоторых вариантах осуществления аденозиндезаминаза катализирует гидролитическое дезаминирование аденина или аденозина в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). Аденозиндезаминазы (например, сконструированные аденозиндезаминазы, эволюционировавшие аденозиндезаминазы), представленные в настоящем описании, могут происходить из любого организма, такого как бактерия. В некоторых вариантах осуществления дезаминаза или домен дезаминазы представляют собой вариант встречающейся в природе дезаминазы из организма, такого как человек, шимпанзе, горилла, обезьяна, корова, собака, крыса или мышь.

В некоторых вариантах осуществления дезаминаза или домен дезаминазы не встречаются в природе. Например, в некоторых вариантах осуществления дезаминаза или домен дезаминазы являются по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%,

по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичным природной дезаминазе.

В некоторых вариантах осуществления аденозиндезаминаза происходит из бактерии, такой как *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, *S. putrefaciens*, *H. influenzae* или *C. crescentus*. В некоторых вариантах осуществления аденозиндезаминаза представляет собой TadA дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления TadA дезаминаза представляет собой TadA дезаминазу *E. coli* (ecTadA). В некоторых вариантах осуществления TadA дезаминаза представляет собой усеченную TadA дезаминазу *E. coli*. Например, в усеченной ecTadA может отсутствовать одна или более N-концевых аминокислот по сравнению с полноразмерной ecTadA. В некоторых вариантах осуществления в усеченной ecTadA может отсутствовать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 6, 17, 18, 19 или 20 N-концевых аминокислотных остатков относительно полноразмерной ecTadA. В некоторых вариантах осуществления в усеченной ecTadA может отсутствовать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 6, 17, 18, 19 или 20 C-концевых аминокислотных остатков относительно полноразмерной ecTadA. В некоторых вариантах осуществления дезаминаза ecTadA не содержит N-концевой метионин. В некоторых вариантах осуществления дезаминаза представляет собой APOBEC1 или ее вариант.

Дезаминазу можно использовать в конъюгации с любым другим элементом CRISPR, раскрытым в настоящем описании (т.е. в виде композиции), или дезаминаза может быть слита с любым другим элементом CRISPR (например, Cas9 или Cpf1), раскрытым в настоящем описании (т.е. в виде комплекса). В некоторых вариантах осуществления дезаминаза слита с Cas9, Cpf1 или их вариантами.

Прочие компоненты.

Композиция дополнительно может содержать любые другие компоненты, обычно используемые в составах для доставки нуклеиновой кислоты или белка. Например, композиция может дополнительно содержать липиды, липопротеины (например, холестерин и производные), фосфолипиды, полимеры или другие компоненты липосомальных или мицеллярных носителей для доставки. Композиция также может содержать растворитель или носитель, подходящий для введения клеткам или хозяевам, таким как млекопитающее или человек.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит второй полимер, который включает полиэтиленоксид (PEG). Например, композиция может содержать PEG-pAsp (DET), PEG-pAsp, производные PEG-pAsp (DET), производные PEG-pAsp или их комбинацию. Не связываясь какой-либо конкретной теорией, считается, что эти ПЭГилированные полимеры могут контролировать размер наночастиц и их взаимодействие с целевыми белками сыворотки и клетками. Полимер полиэтиленоксида можно комбинировать с другими компонентами любым способом и в любом порядке.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит одно или более поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может быть неионным поверхностно-активным веществом и/или цвиттерийным поверхностно-активным веществом. Список типичных поверхностно-активных веществ включает, без ограничения: поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтилен сорбитана (обычно называемых твинами), особенно полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры этиленоксида (EO), пропиленоксида (PO) и/или бутиленоксида (BO), продаваемые под торговым наименованием DOWFAX™, такие как линейные блок-сополимеры EO/PO; октоксинолы, которые могут различаться по количеству повторяющихся этокси (окси-1,2-этандил) групп, при этом октоксинол-9 (тритон X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол) представляет особый интерес; (октилфенокси)полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-6301NP-40); фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (лецитин); простые эфиры полиоксиэтилена и жирных кислот, полученные из лауриловых, цетиловых, стеариловых и олеиловых спиртов (известные как поверхностно-активные вещества Brij), такие как монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30); полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и сложные эфиры сорбитана (обычно известные как Spans), такие как триолеат сорбитана (Span 85) и монолаурат сорбитана. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой антикоагулянт (например, гепарин или тому подобное). В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или наполнителей.

В некоторых случаях компонент (например, компонент нуклеиновой кислоты (например, геновая нуклеиновая кислота и т.д.); белковый компонент (например, полипептид Cas9 или Cpf1, вариант полипептида Cas9 или Cpf1); и т.п.) включает метку. Термины "метка", "детектируемая метка" или "фрагмент-метка" в контексте настоящего описания относятся к любому фрагменту, который позволяет обнаружить сигнал, и может варьировать в широких пределах в зависимости от конкретной природы анализа. Представляющие интерес фрагменты-метки включают как непосредственно детектируемые метки (прямые метки) (например, флуоресцентные метки), так и опосредованно обнаруживаемые метки (непрямые метки) (например, член пары связывания). Флуоресцентная метка может быть любой флуоресцентной меткой (например, флуоресцентный краситель (например, флуоресцеин, техасский красный, родамин, метки

ALEXAFLUOR® и т.п.), флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный GFP (EGFP)), желтый флуоресцентный белок (YFP), красный флуоресцентный белок (RFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), Cherry, Tomato, Tangerine и любые их флуоресцентные производные) и т.д.). Подходящие группы детектируемых (непосредственно или опосредованно) меток для использования в способах включают любую группу, которую можно детектировать спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, электрическими, оптическими, химическими или другими способами. Например, подходящие непрямые метки включают биотин (член пары связывания), который может связываться со стрептавидином (который сам может быть меченым непосредственно или опосредованно). Метки также могут включать: радиоактивную метку (прямая метка) (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P); фермент (непрямая метка) (например, пероксидазу, щелочную фосфатазу, галактозидазу, люциферазу, глюкозооксидазу и т.п.); флуоресцентный белок (прямая метка) (например, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок и любые их удобные производные); металлическую метку (прямая метка); колориметрическую метку; член пары связывания и т.п. Под "партнером пары связывания" или "членом пары связывания" подразумевается один из первого и второго фрагментов, где первый и второй фрагменты обладают специфическим средством связывания друг с другом. Подходящие пары связывания включают, без ограничения: антиген/антитела (например, диоксигенин/анти-диоксигенин, динитрофенил (DNP)/анти-DNP, дансил-Х-анти-дансил, флуоресцеин/анти-флуоресцеин, люцифер желтый/анти-люцифер желтый и родамин анти-родамин), биотин/авидин (или биотин/стрептавидин) и кальмодулин-связывающий белок (CBP)/кальмодулин. Любой член пары связывания может быть подходящим для использования в качестве метки, определяемой опосредованно.

Любой данный компонент или комбинация компонентов могут быть немечеными или мечеными детектируемой меткой. В некоторых вариантах осуществления, когда помечены два или более компонента, они могут быть помечены фрагментами-метками, которые можно отличить друг от друга.

Инкапсуляция и наночастицы.

В некоторых вариантах осуществления композиции полимер объединяется с нуклеиновой кислотой и/или полипептидом и частично или полностью инкапсулирует нуклеиновую кислоту и/или полипептид. В некоторых составах композиции может содержать наночастицы, содержащие полимер и нуклеиновую кислоту и/или полипептид.

В некоторых вариантах осуществления композиции может содержать ядерную наночастицу в дополнение к полимеру по изобретению и нуклеиновой кислоте или полипептиду. Можно использовать любые подходящие наночастицы, включая наночастицы металла (например, золота) или полимерные наночастицы.

Полимер, раскрытый в настоящем описании, и нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК, донорный полинуклеотид или оба) или полипептид могут быть конъюгированы с поверхностью наночастиц непосредственно или опосредованно. Например, раскрытый в настоящем описании полимер и нуклеиновая кислота (например, гидовая РНК, донорный полинуклеотид или оба) или полипептид могут быть конъюгированы с поверхностью наночастицы непосредственно или опосредованно через промежуточный линкер.

В качестве линкера можно использовать любой тип молекулы. Например, линкер может представлять собой алифатическую цепь, включающую по меньшей мере два атома углерода (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более атомов углерода), и может быть замещен одной или более функциональными группами, включая кетон, простой эфир, сложный эфир, амид, спирт, амин, мочевины, тиомочевину, сульфоксид, сульфон, сульфонамидные и дисульфидные функциональные группы. В вариантах осуществления, в которых наночастица включает золото, линкер может быть любой тиолсодержащей молекулой. Взаимодействие тиольной группы с золотом приводит к образованию ковалентной сульфидной (-S-) связи. Конструирование и синтез линкера хорошо известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, конъюгированная с наночастицей, представляет собой линкерную нуклеиновую кислоту, которая служит для нековалентного связывания одного или более элементов, раскрытых в настоящем описании (например, полипептид Cas9 и гидовая РНК, донорный полинуклеотид и полипептид Cpf1), с конъюгатом наночастица-нуклеиновая кислота. Например, линкерная нуклеиновая кислота может иметь последовательность, которая гибридизуется с гидовой РНК или донорным полинуклеотидом.

Нуклеиновая кислота, конъюгированная с наночастицей (например, наночастицей коллоидного металла (например, золота); наночастицей, содержащей биосовместимый полимер), может иметь любую подходящую длину. Когда нуклеиновая кислота представляет собой гидовую РНК или донорный полинуклеотид, длина обычно является подходящей для таких молекул, например, как указано в настоящем описании и известно в данной области. Если нуклеиновая кислота представляет собой линкерную нуклеиновую кислоту, она может иметь любую подходящую для линкера длину, например длину от 10 до 1000 нуклеотидов (нт), например, от примерно 1 до примерно 25 нт, от примерно 25 до примерно 50 нт, от примерно 50 до примерно 100 нт, от примерно 100 до примерно 250 нт, от примерно 250 до примерно 500 нт или от примерно 500 до примерно 1000 нт. В некоторых случаях

нуклеиновая кислота, конъюгированная с наночастицей (например, наночастицей коллоидного металла (например, золота); наночастицей, содержащей биосовместимый полимер), может иметь длину более 1000 нт.

Когда нуклеиновая кислота, связанная (например, ковалентно связанная; нековалентно связанная) с наночастицей, содержит нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется по меньшей мере с частью гидовой РНК или донорного полинуклеотида, присутствующего в комплексе по изобретению, она имеет область с последовательностью, идентичной области комплемента гидовой РНК или донорной полинуклеотидной последовательности, достаточной для облегчения гибридизации. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, связанная с наночастицей в комплексе по настоящему изобретению, имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100% идентичности нуклеотидной последовательности с комплементом длиной от 10 до 50 нуклеотидов (например, от 10 до 15 нт, от 15 до 20 нт, от 20 до 25 нт, от 25 до 30 нт, от 30 до 40 нт или от 40 до 50 нт) гидовой РНК или донорного полинуклеотида, присутствующего в комплексе.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, связанная (например, ковалентно связанная; нековалентно связанная) с наночастицей, представляет собой донорный полинуклеотид или имеет такую же или практически такую же нуклеотидную последовательность, что и донорный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, связанная (например, ковалентно связанная; нековалентно связанная) с наночастицей, содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна донорной ДНК-матрице.

Способ применения.

Полимеры, представленные в настоящем описании, можно использовать для любых целей, но предполагается, что они особенно полезны для комбинирования и в некоторых вариантах осуществления инкапсулирования биологических молекул (например, нуклеиновых кислот и полипептидов) для различных целей. В одном из аспектов предоставляется способ инкапсулирования биологической молекулы, такой как полипептид или нуклеиновая кислота, путем комбинирования полимера по изобретению, как представлено в настоящем описании, с биологической молекулой, посредством чего полимер частично или полностью инкапсулирует биомолекулу. Биомолекулу, частично или полностью инкапсулированную полимером, иногда называют наночастицей.

В настоящем документе также предлагается способ доставки нуклеиновой кислоты и/или полипептида в клетку, где клетка может находиться *in vitro* или *in vivo*. Способ включает введение композиции, содержащей полимер и нуклеиновую кислоту и/или полипептид по настоящему изобретению, в клетку или субъекту, содержащему эту клетку. Способ можно использовать в отношении любого типа клеток или субъекта, но особенно он полезен для клеток млекопитающих (например, клеток человека). В некоторых вариантах осуществления полимер включает нацеливающий агент, такой, что нуклеиновая кислота и/или полипептид доставляются преимущественно или исключительно в целевые клетки или ткани (например, клетки или ткани периферической нервной системы, центральной нервной системы, глаза субъекта, печени, мышцы, легкого, кости (например, гемопоэтические клетки) или опухолевые клетки или ткани).

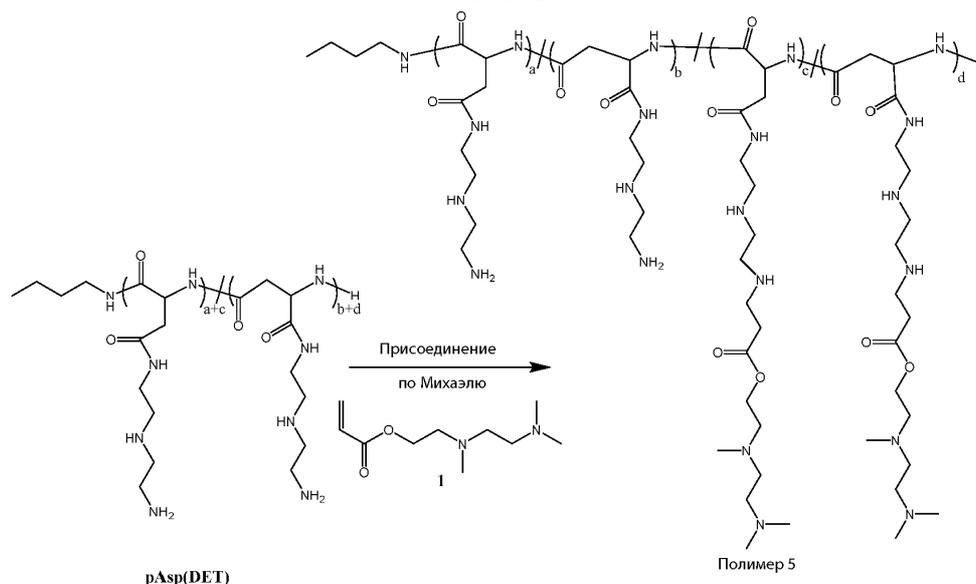
При использовании с композицией, содержащей один или более компонентов системы CRISPR, способ можно применять для индукции редактирования целевой нуклеиновой кислоты или гена. В некоторых вариантах осуществления способ модификации целевой нуклеиновой кислоты включает гомологически направленную репарацию (HDR). В некоторых вариантах осуществления использование комплекса по настоящему изобретению для проведения HDR обеспечивает эффективность HDR по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25% или более чем 25%. В некоторых вариантах осуществления способ модификации целевой нуклеиновой кислоты включает негомологичное соединение концов (NHEJ). В некоторых вариантах осуществления применение комплекса по настоящему изобретению для проведения HDR обеспечивает эффективность NHEJ по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25 или более чем 25%.

Приведенные ниже примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Пример 1.

Настоящий пример представляет собой руководство по синтезу полимера по изобретению. Синтез включает реакцию присоединения акрилата по Михаэлю. Приведенная в качестве примера процедура выглядит следующим образом.

Схема 1



В стеклянном флаконе суспендировали pAsp (DET) (5 мг, 0,22 мкмоль) в диметилсульфоксиде ("DMSO"; 700 мкл). К суспензии добавляли 30 мкл триметиламина ("TEA") и полученную суспензию перемешивали до полного растворения всех полимеров. К реакционной смеси добавляли акрилат 1 (1,15 мг, 5,5 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 40 ч при комнатной температуре. Неочищенный продукт очищали осаждением ацетонитрилом и трижды промывали ацетонитрилом, получая 4 мг полимера 5, где (a+b) равно 55 и (c+d) равно 25.

$^1\text{H NMR}$ (400 МГц, D_2O): δ 4,8-4,6 (bs, 4H), 4,2 (т, 2H), 3,4-2,4 (м, 40H).

Как показано на схеме 1, реакция присоединения акрилата 1 по Михаэлю приводит к образованию связи на основе амина (см., например, полимер 5). Таким образом, исходная функциональная амино-группа в pAsp (DET) остается нетронутой.

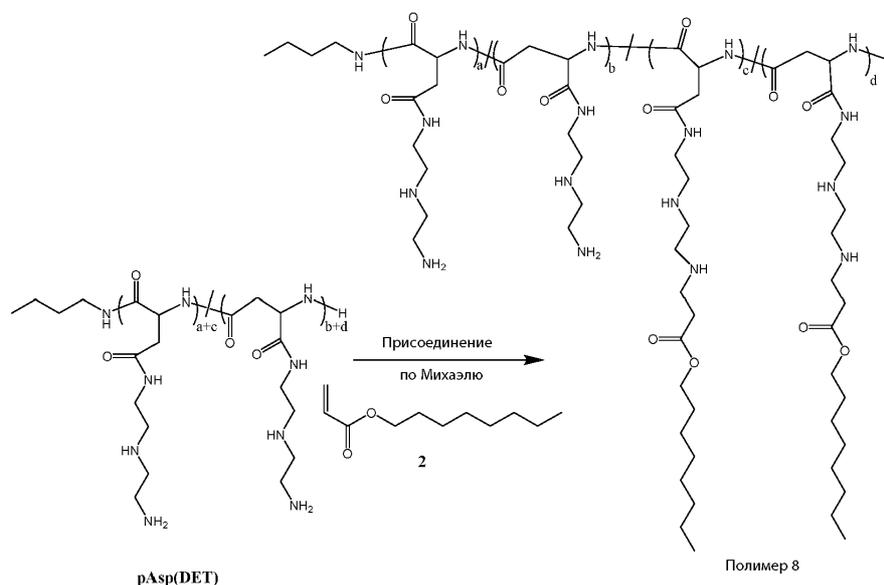
Аналогичную процедуру можно использовать для получения дополнительных полимеров формулы 1 (например, полимеров 1-4 и 6-12). Нуклеофильное замещение можно использовать для получения полимеров 28 и 29.

Кроме того, эту процедуру можно применить к другому исходному полимеру, такому как полимер, полученный в Примере 7, для получения других полимеров формулы 1 (например, этим способом можно получить полимеры 13-24 из полимера 30 или 32, деметилированного по концевому азоту для получения первичного или вторичного амина).

Пример 2.

Настоящий пример представляет собой руководство по синтезу полимера по изобретению. Синтез включает реакцию присоединения акрилата по Михаэлю. Приведенная в качестве примера процедура выглядит следующим образом.

Схема 2



В стеклянном флаконе суспендировали pASP (DET) (5 мг, 0,22 мкмоль) в безводном метаноле (300 мкл) и к суспензии добавляли 30 мкл триэтиламина ("TEA"). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин до полного растворения полимера. Раствор разбавляли 300 мкл DCM. К реакционной смеси добавляли акрилат 2 (1,05 мг, 5,5 мкмоль) в 30 мкл DCM и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч. Неочищенный продукт очищали осаждением в большом избытке диэтилового эфира с получением 4,3 мг полимера 8, где (a+b) равно 55 и (c+d) равно 25.

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O): δ 4,8-4,6 (уш.с, 4H), 4,03 (т, 2H), 3,8-2,5 (м, 27H), 1,5 (т, 2H), 1,25 (с, 12H), 0,7 (т, 3H).

Как показано на схеме 2, реакция присоединения акрилата 2 по Михаэлю приводит к образованию связи на основе амина (см., например, полимер 8). Таким образом, исходная аминная функциональная группа в pAsp (DET) остается нетронутой.

Пример 3.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять рибонуклеопротеин Cas9 ("РНП Cas9") в клетку. Уровень доставки РНП Cas9 оценивали в клетках HEK293T ("GFP-НЕК"), индуцируемых зеленым флуоресцентным белком ("GFP").

10 пмоль РНП Cas9 смешивали с (i) полимером 5, (ii) полимером 8 и (iii) pAsp (DET), использованным в качестве контроля. Клетки GFP-НЕК обрабатывали полученной смесью в условиях без сыворотки. Полимеры добавляли в дозах 0,375, 0,75, 1,25, 2,5, 5 и 10 мкг для выбора оптимальной дозы, которая обеспечивает наивысшую эффективность и минимальную токсичность. Результаты представлены на фиг. 3.

На фиг. 3 показан уровень доставки РНП Cas9, измеренный по проценту GFP(-) в клетках GFP-НЕК, обработанных тремя смесями. Все три полимера (т.е. полимер 5, полимер 8 и pAsp (DET)) показали одинаковые уровни редактирования генов в дозах полимера от 0,375 до 2,5 мкг. Однако полимер 8 и pAsp (DET) продемонстрировали высокий уровень токсичности для клеток (жизнеспособность клеток менее 50%) в дозах полимера 5 и 10 мкг. При этом полимер 5 обеспечил оптимальную доставку в дозе полимера 5 мкг, о чем свидетельствует уровень GFP%, без значимой токсичности.

Пример 4.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять в клетки Cre-рекомбиназу, которая может изменять последовательности loxP.

Используя первичные миобласты мышей Ai9, которые содержат стоп-последовательность между loxP (серая стрелка на фиг. 4), уровень доставленной рекомбиназы Cre можно измерить по экспрессии RFP. Репортерный аллель Ai9 содержит кассету STOP, фланкированную последовательностью loxP, что предотвращает транскрипцию RFP. Рекомбиназа Cre удаляет кассету STOP, фланкированную последовательностью loxP, тем самым обеспечивая транскрипцию RFP.

Cre-рекомбиназу (2 мкг) смешивали с (i) полимером 5 и (ii) pAsp (DET), использованным в качестве контроля, для получения наночастиц. Полимеры добавляли в дозах 1,25, 2,5, 5 и 10 мкг для определения оптимальной дозы, которая обеспечивает наивысшую эффективность и минимальную токсичность. Миобласты Ai9 обрабатывали полученными наночастицами, и методом проточной цитометрии выполняли количественное определение RFP+ через 4 дня после обработки. Результаты представлены на фиг. 5.

На фиг. 5 показан уровень доставки Cre-рекомбиназы в первичные миобласты, измеренный по уровню экспрессии RFP+. Как показано на фиг. 5, полимер 5 обеспечивал более высокие уровни экспрессии RFP+, чем контроль (pAsp (DET)) в дозах полимера 5, 10 и 20 мкг, что свидетельствует о том, что в более высоких дозах полимер 5 обеспечивает более эффективную доставку рекомбиназы Cre по сравнению с pAsp (DET).

Пример 5.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять Cre-рекомбиназу *in vivo* мышам.

Мышам Ai9 вводили (i) только Cre-рекомбиназу и (ii) наночастицы пэгиллизованного полимера (т.е. смесь полимера 5 и ПЭГ-полимера), инкапсулирующие Cre-рекомбиназу. Cre-рекомбиназу (35 мкг) доставляли со смесью полимера 5 и PEG-PAsp (DET) (100 мкг). Смесь полимера 5 с PEG-PAsp (DET) позволяет контролировать размер полимерных наночастиц. Через две недели после инъекции собирали икроножные мышцы мышей Ai9. Полученные поперечные срезы мышц визуализировали для обнаружения белка красной флуоресценции, который генерировался в результате рекомбинации ДНК. Результаты представлены на фиг. 6.

На фиг. 6 показано, что полимерные наночастицы улучшают доставку рекомбиназы Cre в мышечную мышцу. Инъекция рекомбиназы Cre приводила к экспрессии RFP только в ограниченных участках мышц, о чем свидетельствует меньше количество областей визуализированного белка красной флуоресценции. В то же время инъекция Cre-рекомбиназы, инкапсулированной в полимерной наночастице, обеспечивает экспрессию RFP в большинстве областей икроножной мышцы.

Проблема доставки белка заключается в том, насколько широко может доставляться белок и влиять на большее количество участков ткани. Наночастицы, полученные из смеси полимера 5 и пэгполимера,

могут эффективно доставлять рекомбиназу Cre и способствуют ее распределению в организме мышей ai9.

Пример 6.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять Cas9 в нейрональные клетки, экспрессирующие GFP.

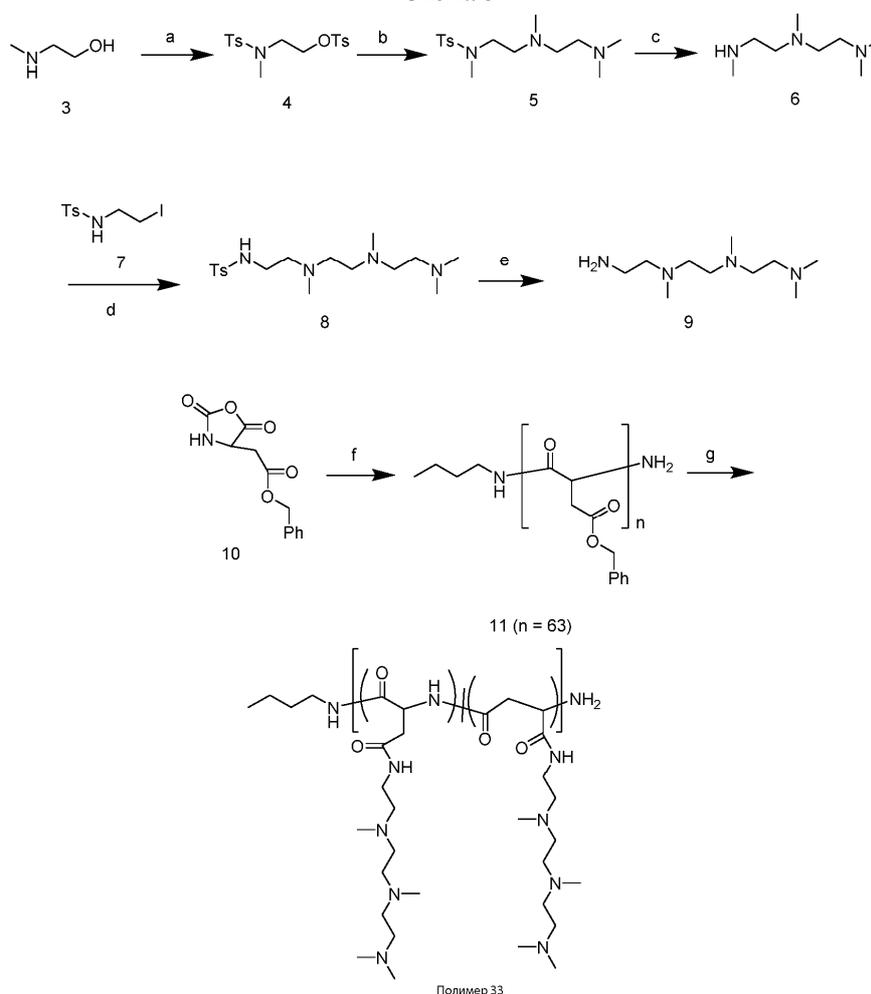
Для определения, может ли полимер 5 доставлять РНП Cas9 в нейрональные клетки, использовали экспрессирующие GFP нейрональные клетки, которые были дифференцированы из нейрональных клеток-предшественников. Нейрональные клетки, экспрессирующие GFP, обрабатывали отРГК и белком Cas9, используя полимеры, раскрытые в настоящем описании в качестве средства доставки. Через семь дней после обработки из клеток экстрагировали геномную ДНК, и выполняли ПЦР-амплификацию гена GFP. Для измерения частоты индел-мутаций в результате редактирования гена Cas9 выполняли анализ TIDE (программное обеспечение TIDE от Desktop Genetics, Netherlands Cancer Institute). Результаты представлены на фиг. 7.

Как показано на фиг. 7, полимер 5 был способен доставлять РНП Cas9 и индуцировать 11% индел-мутаций в нейрональных клетках.

Пример 7.

Настоящий пример представляет собой руководство по синтезу раскрытого в настоящем описании полимера. Синтез включает полимеризацию с раскрытием кольца с последующей модификацией для получения полимера формулы 4. Приведенная в качестве примера процедура является следующей.

Схема 3



Синтез полимера 33: (a) тозилхлорид, TEA, DCM; (b) N, N,N-триметилэтилендиамин, K₂CO₃, ацетонитрил, кипячение с обратным холодильником; (c) LiAlH₄, THF; (d) соединение 7, K₂CO₃, ацетонитрил, кипячение с обратным холодильником; (e) LiAlH₄, THF; (f) бутиламин, DCM-DMF (9:1), 48 ч; (g) соединение 9, NMP, 6 ч.

Как показано на схеме 3, полимеризация соединения 10 с раскрытием кольца приводит к образованию соединения 11 с n=63, которое может быть дополнительно модифицировано с образованием полимера 33 после обработки соединением 9.

Аналогичную процедуру можно использовать для получения других полимеров формулы 4 (например, полимеров 30-32). Кроме того, концевой третичный амин на боковых цепях полимера может быть деметилирован обычными методами с получением полимеров 39-42.

Пример 8.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять в клетку Cre-рекомбиназу, которая может изменять последовательности loxP.

Используя клетки, содержащие репортер Traffic Light Reporter ((TLR)-НЕК 293Т), которые были созданы с помощью вирусной трансдукции Traffic Light Reporter в НЕК 293Т (см. фиг. 8), можно измерить уровень экспрессии доставленной Cre-рекомбиназы с помощью красного флуоресцентного белка ("RFP"). Traffic Light Reporter в НЕК 293Т содержит кассету STOP и две последовательности loxP, фланкирующие последовательность GFP, тем самым предотвращая транскрипцию RFP и, в свою очередь, экспрессируя GFP в отсутствие Cre Cre-рекомбиназа удаляет последовательности loxP и обеспечивает транскрипцию RFP.

Cre-рекомбиназу (1 мкг) смешивали с полимером 33, полученным в примере 7, или pAsp (DET), использованным в качестве образца сравнения, для получения наночастиц. Полимеры добавляли в дозах 1,25 мкг или 2,5 мкг для выбора оптимальной дозы, которая обеспечивает наивысшую эффективность и минимальную токсичность. Клетки TLR НЕК293Т обрабатывали полученными наночастицами, и выполняли количественное определение RFP+ методом проточной цитометрии через 3 дня после обработки. Результаты представлены на фиг. 9.

На фиг. 9 показан уровень доставки Cre-рекомбиназы в клетки (TLR)-НЕК 293Т, измеренный по уровню экспрессии RFP+. Как показано на фиг. 9, полимер 33 обеспечивает улучшенную доставку по сравнению с образцами, содержащими только Cre, и образцом сравнения pAsp (DET) в дозах полимера 1,25 и 2,5 мкг.

Пример 9.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять в клетку рибонуклеопротеин Cas9 ("РНП Cas9"). Уровень доставки РНП Cas9 оценивали в клетках НЕК293Т ("GFP-НЕК"), индуцируемых зеленым флуоресцентным белком ("GFP").

15 пмоль РНП Cas9 (огРНК+белок Cas9) смешивали с полимером 33, полученным в примере 7, или pAsp (DET), использованным в качестве образца сравнения, с получением наночастиц. Полимеры добавляли в дозе 2,5 мкг. Клетки GFP-НЕК обрабатывали полученной смесью в условиях, не содержащих сыворотку. Результаты представлены на фиг. 10.

На фиг. 10 показан уровень доставки РНП Cas9, измеренный по GFP% в клетках GFP-НЕК, обработанных двумя смесями. Оба полимера (т.е. полимер 33 и pAsp (DET)) показали способность доставлять РНП Cas9 в дозе полимера 2,5 мкг по сравнению с контролем. Однако в дозе 2,5 мкг полимер 33 оказался более эффективным, чем pAsp (DET).

Пример 10.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять нуклеиновые кислоты. Уровень доставки мРНК eGFP в клетки НЕК 293Т оценивали с помощью зеленого флуоресцентного белка ("GFP").

мРНК eGFP (200 нг) смешивали с полимером 33 (600 нг), полученным в примере 7, и инкубировали в течение 5 мин. Полученные полимерные наночастицы вводили в клетки НЕК 293Т в среде OptiMEM. Через 24 ч клетки отделяли от планшета и анализировали проточной цитометрией. Липофектамин использовали в качестве положительного контроля для доставки мРНК eGFP. Результаты представлены на фиг. 11.

На фиг. 11 показано, что по сравнению с контролем полимер 33 обеспечивает улучшенную доставку мРНК eGFP в клетки НЕК 293Т.

Пример 11.

В этом примере показано влияние времени инкубации на способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять нуклеиновые кислоты. Уровень доставки мРНК eGFP в клетки НЕК 293Т оценивали с помощью зеленого флуоресцентного белка ("GFP").

мРНК eGFP (200 нг) смешивали с полимером 33 (1,2 мкг), полученным, как описано в примере 7, и инкубировали в течение 2, 5, 10 и 30 мин. Полученные полимерные наночастицы вводили в клетки НЕК 293Т в среде OptiMEM. Через 24 ч клетки отделяли от планшета и анализировали проточной цитометрией. Липофектамин использовали в качестве положительного контроля для доставки мРНК eGFP. Результаты представлены на фиг. 12.

На фиг. 12 показано, что наночастицы, образованные в течение 2 мин после инкубации, и полимер 33 обеспечивали эффективную доставку мРНК eGFP во всех временных интервалах инкубации.

Пример 12.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять мРНК. Уровень доставки мРНК красного флуоресцентного белка ("RFP") в клетки НЕК 293Т оценивали по уровню экспрессии RFP+.

мРНК RFP (200 нг) смешивали с полимером 33, полученным, как описано в примере 7, или pAsp

(DET), использованным в качестве образца сравнения, для получения наночастиц. Полимер 33 и pAsp (DET) добавляли в дозах (i) 600 нг или (ii) 480 нг в комбинации со 120 нг полимера PEG-PAsp (DET) размером 1,5 кДа. Полимер PEG-PAsp (DET) 1,5 кДа позволяет контролировать размер наночастиц. Клетки TLR HEK293T обрабатывали полученными наночастицами, и выполняли количественное определение RFP+ методом проточной цитометрии через 24 часа после обработки. Результаты представлены на фиг. 13.

На фиг. 13 показано, что по сравнению с полимером сравнения (Pasp (DET)) полимер 33 улучшал доставку мРНК в клетки HEK 293T в отсутствие полимера PEG-PAsp (DET) 1,5 кДа. Кроме того, на фиг. 13 видно, что 600 нг полимера 33 обеспечивают более эффективную доставку мРНК в клетки HEK 293T, чем 480 нг полимера 33 в комбинации со 120 нг полимера PEG-PAsp (DET) 1,5 кДа.

Пример 13.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять мРНК. Уровень доставки мРНК красного флуоресцентного белка ("RFP") в клетки HEK 293T оценивали по уровню экспрессии RFP+.

мРНК RFP (200 нг) смешивали с полимером 33, полученным в примере 7, или pAsp (DET), использованным в качестве образца сравнения, для получения наночастиц. Полимер 33 и pAsp (DET) добавляли в дозах (i) 1 мкг или (ii) 800 нг в комбинации с 200 нг полимера PEG-PAsp (DET) размером 1,5 кДа. Полимер PEG-PAsp (DET) 1,5 кДа позволяет контролировать размер наночастиц. Клетки TLR HEK293T обрабатывали полученными наночастицами и выполняли количественное определение RFP+ методом проточной цитометрии через 24 часа после обработки. Результаты представлены на фиг. 14.

На фиг. 14 показано, что по сравнению с полимером сравнения (PAsp (DET)) полимер 33 обеспечивает сопоставимую доставку мРНК в клетки HEK 293T как в присутствии, так и в отсутствие полимера PEG-PAsp (DET) 1,5 кДа в дозах (i) 1 мкг или (ii) 800 нг в комбинации с 200 нг полимера PEG-PAsp (DET) 1,5 кДа.

Пример 14.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров доставлять рибонуклеопротеин Cas9 ("РНП Cas9") в клетку при использовании различных буферов. Уровень доставки РНП Cas9 оценивали в клетках HEK293T ("GFP-HEK"), индуцируемых зеленым флуоресцентным белком ("GFP").

30 пмоль РНП Cas9 (огРНП+белок Cas9) смешивали с 4 мкг полимера 33, полученного как описано в примере 7, или с 5 мкг pAsp (DET), использованного в качестве сравнения, для получения наночастиц. Клетки GFP-HEK (200000 клеток) обрабатывали в средах с тремя разными буферными системами, а именно (i) (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоново́й кислотой) ("HEPES"; 20 мМ), (ii) Opti-MEM™ (коммерчески доступен от компании Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA), или средой Игла, модифицированной Дульбекко ("DMEM"; коммерчески доступна от Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Результаты представлены на фиг. 15.

На фиг. 15 показан уровень доставки РНП Cas9, измеренный по процентному содержанию GFP(-) в клетках GFP-HEK, обработанных двумя смесями (т.е. 4 мкг полимера 33 или 5 мкг pAsp (DET)) в трех разных буферных системах. Оба полимера (т.е. полимер 33 и pAsp (DET)) имели одинаковую тенденцию в трех разных буферных системах: среда HEPES оказалась более предпочтительной, чем Opti-MEM™, а Opti-MEM™ более предпочтительной, чем DMEM. Кроме того, полимер 33 оказался более эффективным, чем pAsp (DET) во всех трех буферных системах.

Пример 15.

В этом примере показана способность раскрытых в настоящем описании полимеров стабильно инкапсулировать нуклеиновую кислоту.

Полимеры 2, 5 и 33 по настоящему изобретению (1 мкг/мкл, 10 мМ HEPES) смешивали с помощью пипетки с олигонуклеотидами (1 мкг/мкл, 10 мМ HEPES) в массовом соотношении 5:1, а затем оставляли на 10 минут при комнатной температуре для образования наночастиц. Полученные наночастицы хранили при температуре 4°C. Наночастицы из исходного материала разводили в соотношении ~1:20, используя 10 мМ HEPES, и определяли динамическое светорассеяние (DLS) через 0, 3, 5 и 7 дней (n=1) после приготовления. Средний размер частиц, определенный по интенсивности рассеянного света, показан на фиг. 18.

Наблюдаемый размер наночастиц находился в пределах от 150 до 350 нм. В течение 7 дней наблюдения полимеры показали минимальное изменение размера, что указывает на стабильность наночастиц. Изменение размера наночастиц pAsp [DET], использованного в качестве контроля (данные не показаны), в день 7 было немного больше, чем у других протестированных наночастиц.

Пример 16.

В этом примере показано получение полимера по изобретению.

100 мг (0,0074 ммоль) поли(β-бензил-L-аспартата) (PBLA) растворяли в 3 мл NMP. В эту реакционную смесь добавляли 1,5 г 1,4,7,10-тетраметил-триэтилтетрамина и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Неочищенную реакционную смесь осаждали диэтиловым

эфиром и неочищенный продукт собирали центрифугированием (5000g в течение 15 мин). Неочищенный продукт растворяли в 3 мл 1 М HCl и подвергали диализу против воды для достижения pH 6. Полученный раствор полимера лиофилизировали с получением полимера 41 в виде белого порошка.

Пример 17.

В этом примере показано использование раскрытых в настоящем описании полимеров для доставки мРНК в клетку.

мРНК, кодирующую зеленый или красный флуоресцентный белок, смешивали с тестируемым полимером и объединяли с клетками одного из нескольких разных типов, как указано в табл. 2. Трансфекцию измеряли как функцию флуоресценции. Результаты представлены в табл. 2, которые показывают, что почти все полимеры обеспечивают некоторый уровень трансфекции по меньшей мере в одном типе клеток.

Таблица 2

| Полимер | Гепатоцит | | первичный миобласт мышцы | | нервная стволовая клетка | | HEK293 | Гемопозитическая стволовая клетка |
|---------------|-----------|--------|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|---------------|-----------------------------------|
| | HUH-7 | HEP G2 | Без сыворотки | сыворотка | Без сыворотки | сыворотка | Без сыворотки | сыворотка |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0.0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4.1 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 12 | 1 | 0 | 0.3 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0.0 |
| 5 | 0 | 0 | 3 | 1 | 19 | 3 | 12 | 0.2 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 |
| 7 | 9 | 0 | 0 | 1 | 7 | 3 | 6 | 1.9 |
| 8 | 7 | 0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 9 | 0 | 0 | 25 | 0 | 4 | 2 | 3 | 0.9 |
| 10 | 0 | 0 | 8 | 0 | 25 | 3 | 19 | 0.7 |
| 11 | 0 | 0 | 23 | 0.5 | 18 | 4 | 25 | 0.2 |
| 12 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | 9 | N/A |
| 33 | 0 | 0 | 26 | 2 | 41 | 4 | 27 | N/A |
| Липофект амин | 84 | 43 | 39 | 52 | 49 | N/A | 26 | 0.0 |
| Mock | 0 | 0 | 0 | 0 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| pAsp[DET] | 0 | 0 | N/A | N/A | 39 | 3 | 28 | 0.0 |

N/A = Не тестировали.

Mock = полимер без мРНК.

Тестирование мышинных первичных миобластов осуществляли, используя мРНК, кодирующую зеленый флуоресцентный белок. Все другие типы клеток тестировали с помощью мРНК, кодирующей красный флуоресцентный белок.

В настоящем описании представлены предпочтительные варианты осуществления изобретения, в том числе способ осуществления изобретения, лучший из известных изобретателям. После изучения предшествующего описания для специалистов в данной области техники могут стать очевидными изменения этих предпочтительных вариантов осуществления. Изобретатели ожидают, что специалисты в данной области станут использовать такие варианты в зависимости от обстоятельств, и что изобретение будет реализовано на практике иным образом, чем оно раскрыто в настоящем описании. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, в той степени, в которой это разрешено применимым законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариациях охвачена изобретением, если иное не указано в настоящем описании или в явном виде не противоречит контексту.

Если предоставляется диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение, вплоть до десятичной единицы нижнего предела, если из контекста в явном виде не следует иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным

значением в указанном диапазоне входит в объем изобретения. Верхний и нижний пределы этих более узких диапазонов могут независимо быть включены в более узкие диапазоны, и они также входят в объем изобретения с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в объем изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, в котором они обычно понимаются специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные раскрытым в настоящем описании, также могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, в настоящем описании представлены предпочтительные методы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки для раскрытия и описания методов и/или материалов, в связи с которыми приведена ссылка на эти публикации.

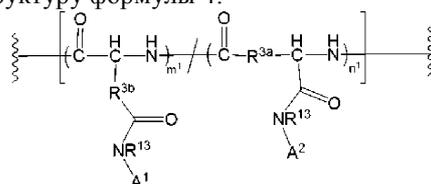
Следует отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "комплекс" включает множество таких комплексов, а ссылка на "полипептид Cas9" включает ссылку на один или более полипептидов Cas9 и их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и т.д. Кроме того, следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы она исключала любой необязательный элемент. Таким образом, это утверждение предназначено в качестве априорного основания для использования такой исключающей терминологии, как "исключительно", "только" и т.п. в связи с перечислением элементов пункта формулы изобретения или для использования "отрицательного" ограничения.

Понятно, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящиеся к изобретению, конкретно охвачены настоящим изобретением и раскрыты в настоящем описании так же, как если бы каждая комбинация была раскрыта отдельно и в явном виде. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементы также конкретно охвачены настоящим изобретением и раскрыты в настоящем описании, как если бы каждая такая подкомбинация была раскрыта в настоящем описании отдельно и в явном виде.

Публикации, обсуждаемые в настоящем описании, предоставлены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не может быть датировано датой, более ранней чем указанная публикация, в силу наличия более раннего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

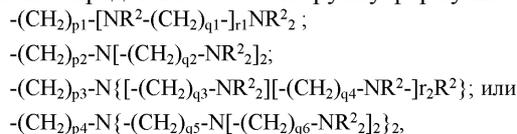
1. Полимер, содержащий структуру формулы 4:



где каждый из m^1 и n^1 представляет собой целое число от 0 до 1000 при условии, что сумма m^1+n^1 больше чем 2;

символ "/" указывает, что разделенные таким образом звенья связаны случайным образом или в любом порядке;

каждый из A^1 и A^2 независимо представляет собой группу формулы:



где каждый из $p1-p4$, $q1-q6$ и $r1$ и $r2$ независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

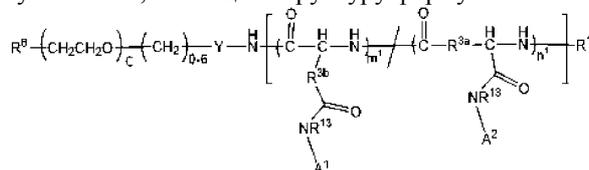
каждый R^2 независимо представляет собой водород или C_1-C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу при условии, что каждый из A^1 и A^2 содержит по меньшей мере один третичный амин;

каждый из R^{3a} и R^{3b} независимо представляет собой метиленовую или этиленовую группу;

каждый R^{13} независимо представляет собой водород или C_1-C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу.

2. Полимер по п.1, где группы A^1 и A^2 каждый включает по меньшей мере два третичных амина.
3. Полимер по п.1, где в группах A^1 и A^2 каждый атом азота, содержащий заместители R^2 , представляет собой третичный амин, за исключением того, что концевой амин может быть первичным, вторичным или третичным амином.
4. Полимер по п.1, где в группах A^1 и A^2 каждый из R^2 представляет собой этил или метил, за исключением того, что концевой амин A^1 и A^2 может быть первичным, вторичным или третичным амином.
5. Полимер по любому из пп.1-4, где в группах A^1 и A^2 концевой амин представляет собой вторичный или третичный амин.
6. Полимер по п.1, где каждый из A^1 и A^2 представляет собой группу формулы

$$-(CH_2)-NR^2-(CH_2)-NR^2,$$
где R^2 в каждом случае независимо представляет собой C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, за исключением того, что концевой амин представляет собой первичный, вторичный или третичный амин.
7. Полимер по п.6, где R^2 групп A^1 и A^2 в каждом случае представляет собой этил или метил, за исключением того, что концевой амин групп A^1 и A^2 может быть первичным, вторичным или третичным амином.
8. Полимер по любому из пп.1-7, где R^{13} представляет собой водород.
9. Полимер по любому из пп.1-7, где R^{13} представляет собой метил.
10. Полимер по любому из пп.1-9, имеющий структуру формулы 4А:



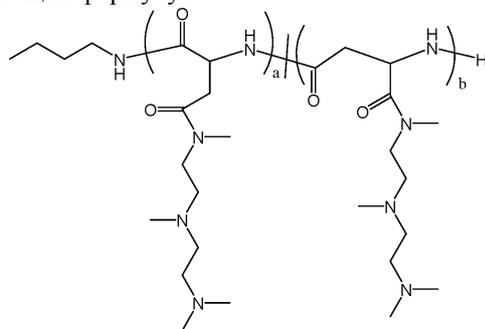
где c представляет собой целое число от 0 до 50;

Y необязательно присутствует и является расщепляемым линкером;

R^6 представляет собой водород, аминогруппу, арильную группу, гетероциклическую группу, C_1 - C_{12} -алкильную группу, алкенильную группу, циклоалкильную группу или циклоалкенильную группу, линейную или разветвленную C_1 - C_{12} -алкильную группу, необязательно замещенную одним или более аминами; или тканеспецифический или клеткоспецифический нацеливающий фрагмент.

11. Полимер по любому из пп.1-10, представляющий собой катионный полимер.

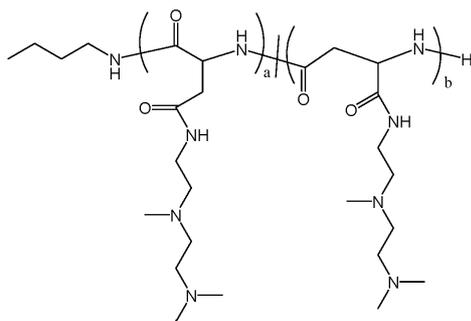
12. Полимер по п.1, имеющий формулу:



Polymer 30

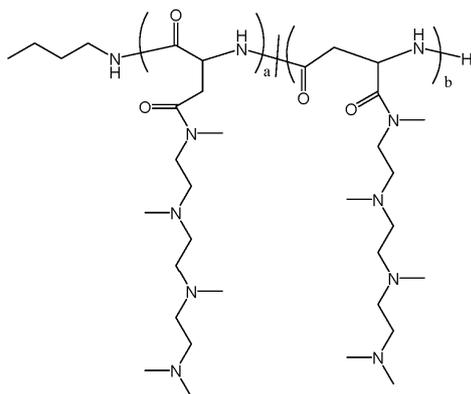
, или

046334



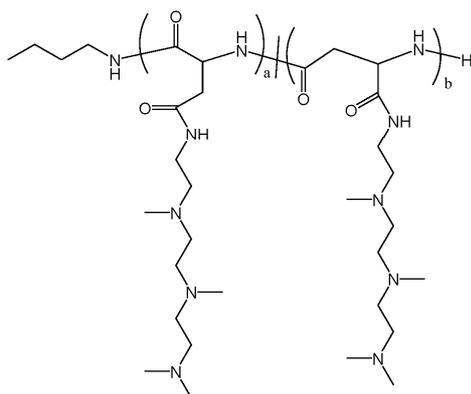
Polymer 31

, ИЛИ



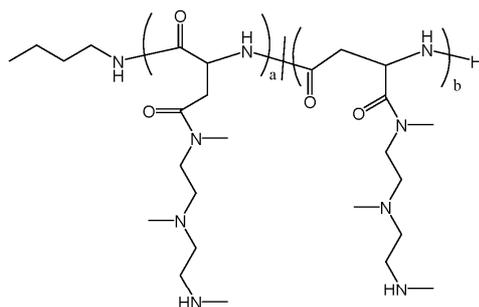
Polymer 32

, ИЛИ



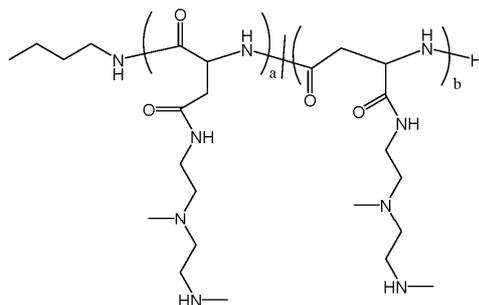
Polymer 33

, ИЛИ



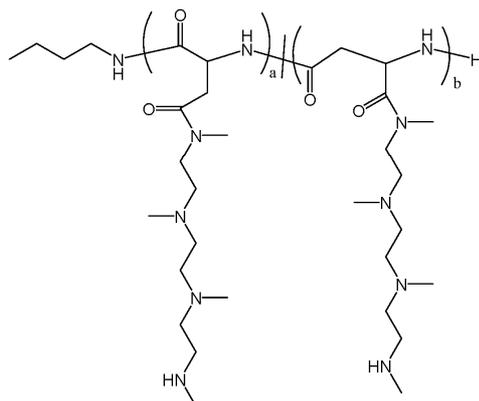
Polymer 39

, ИЛИ



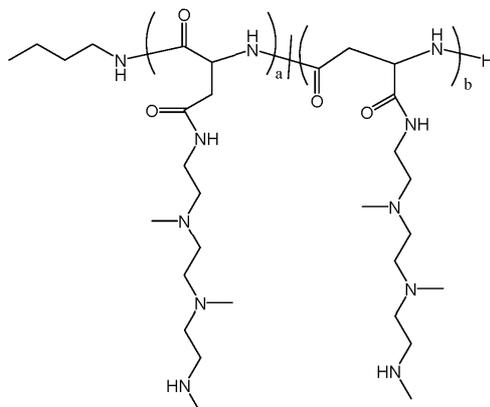
Polymer 40

, ИЛИ



Polymer 41

ИЛИ

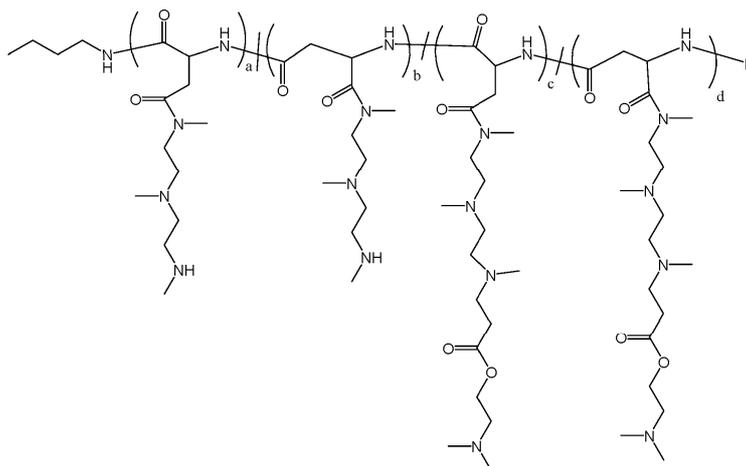


Polymer 42

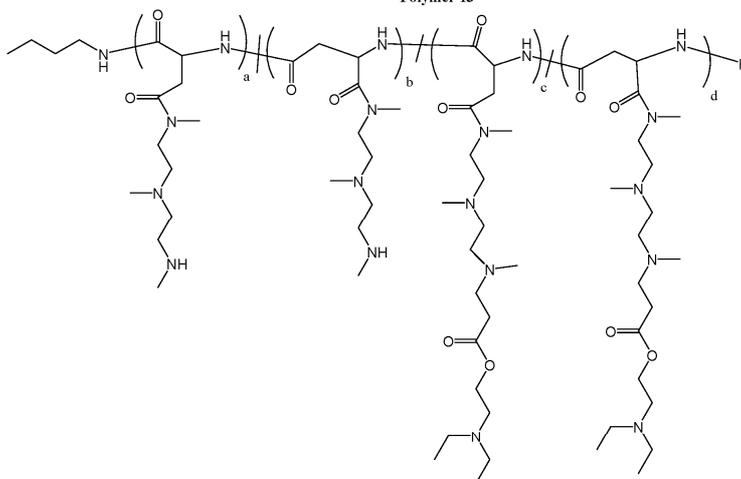
где (a+b) находится в пределах от 5 до 160.

13. Полимер по п.1, имеющий формулу:

046334

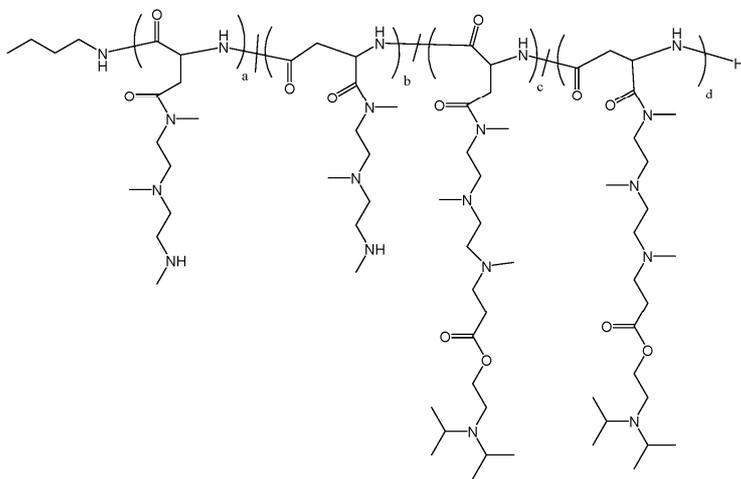


Polymer 13



Polymer 14

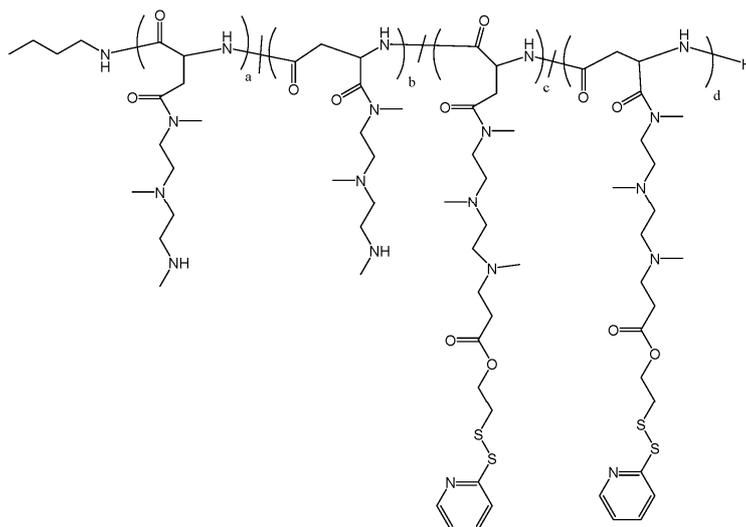
ИЛИ



Polymer 15

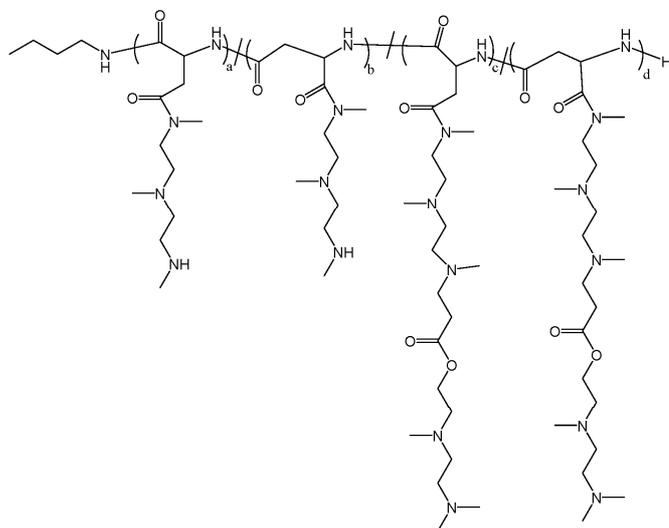
ИЛИ

046334



Polymer 16

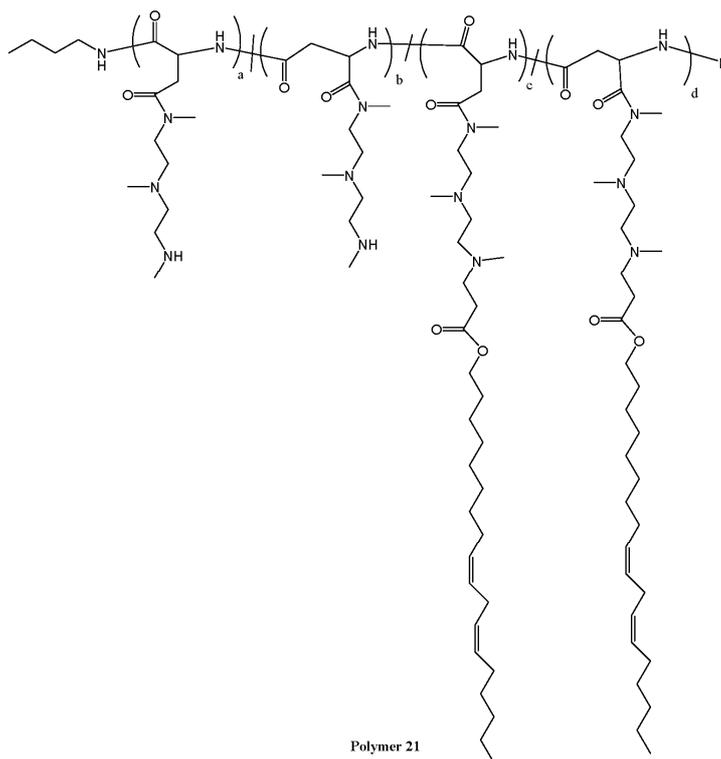
ИЛИ



Polymer 17

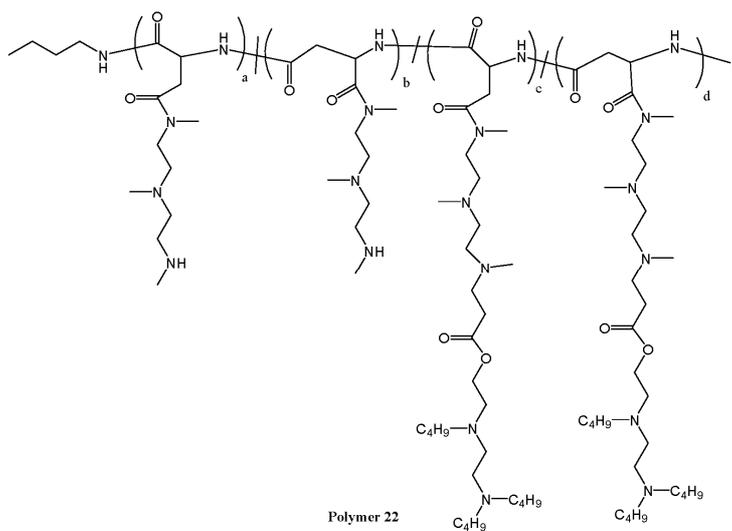
ИЛИ

046334



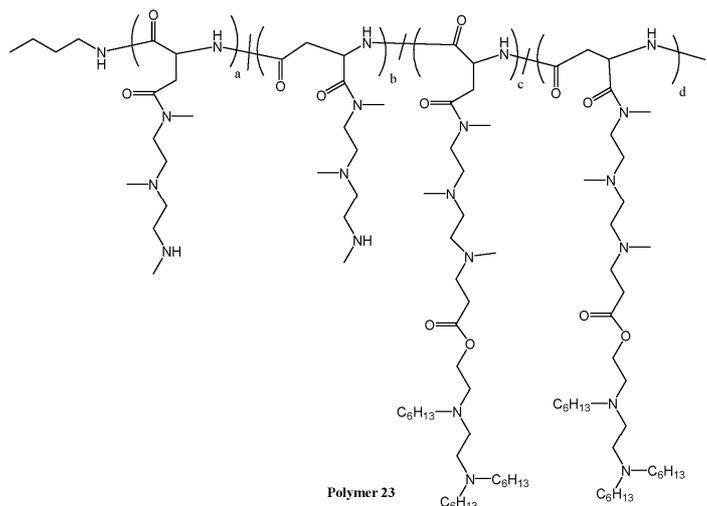
Polymer 21

ИЛИ

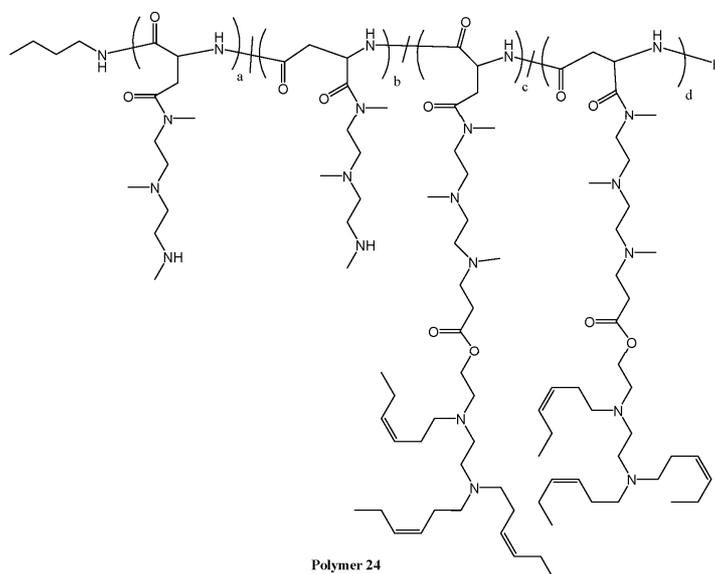


Polymer 22

ИЛИ



ИЛИ



где (a+b) составляет от 5 до 75 и (c+d) составляет от 5 до 80.

14. Композиция для доставки нуклеиновой кислоты и/или полипептида в клетку, содержащая полимер по любому из пп.1-13 и нуклеиновую кислоту и/или полипептид.

15. Композиция по п.14, где клетка находится в организме субъекта.

16. Композиция по п.14 или 15, где полимер частично или полностью инкапсулирует нуклеиновую кислоту и/или полипептид.

17. Композиция по любому из пп.14-16, содержащая гидовую нуклеиновую кислоту и/или донорную нуклеиновую кислоту.

18. Композиция по любому из пп.14-17, содержащая эндонуклеазу.

19. Композиция по п.18, содержащая РНК-управляемую эндонуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую ее.

20. Композиция по п.19, в которой РНК-управляемая эндонуклеаза представляет собой Cas9, Cpf1 или их комбинацию.

21. Композиция по любому из пп.14-20, содержащая ДНК-рекомбиназу.

22. Композиция по п.21, в которой ДНК-рекомбиназа представляет собой Cre-рекомбиназу.

23. Композиция по любому из пп.14-22, содержащая цинк-пальцевую нуклеазу.

24. Композиция по любому из пп.14-23, содержащая эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции.

25. Композиция по любому из пп.14-24, содержащая второй полимер, который содержит полиэтиленоксид.

26. Способ доставки нуклеиновой кислоты и/или полипептида в клетку, включающий введение в клетку композиции по любому из пп.14-25.

27. Способ по п.26, где клетка находится в организме субъекта и субъекту вводят композицию по

любому из пп.14-25.

28. Способ по п.26 или 27, где полимер содержит тканеспецифический нацеливающий фрагмент, который локализует полимер в тканях периферической нервной системы, центральной нервной системы, печени, мышц, легких, костей или глаза субъекта.

29. Способ по п.28, где полимер содержит нацеливающий фрагмент, который предпочтительно связывается с опухолевыми клетками.

30. Способ по любому из пп.26-29, где композиция содержит одно или более из: РНК-управляемую эндонуклеазу или кодирующую ее нуклеиновую кислоту, гидовую нуклеиновую кислоту и донорную нуклеиновую кислоту, причем композиция облегчает редактирование целевого гена в клетке.

Streptococcus pyogenes Cas9
GenBank AXP81606

```

1 mdkkys[glg]lqtnavgwaw [tdddykvpak kfkvlqntdr hsikknliga llfdsgetae
61 atrlkrtaarr rytrrknrlic vlqefanem akvddsfhr leesflveed kkherrpifg
121 nivdevayhe kyptiyhirk klvdstdkad lrliylalah mikfrghfli egdlndpsnd
181 vdklfiqlvq tynqlfeenp inasgvdaka ilsarlsker rienliaqlp gekknslfgn
241 lialslgltp nfkanfldae daklqlskdt ydddidnlla qigdqyadlf laaknlsdai
301 llsdilrvnt eitkaplsas mikrydehhq dtllkalvr qqipekykel ffdqskngya
361 qyidqgasqo efykfkpfil ekmdqteell vknredilr kqrtfdngsi phqihigelh
421 ailrrqedfy pflkdnreki ekiltfripy yvqplargns rfawmtrkse etitpwnfee
481 vvdkgasaqs fiermtnfdk nlpnekvlpk hallyeyftv yneltkvkyv tegmrkpafl
541 egeqkkaivd llfktnrkvt vkqikedyfk kiecfdsvei sqvedrfnas lqtyhdilki
601 ikdkdfldne enedilediv ltlilfedre mieerlktya hifddkvakq ikrrrytgwq
661 rlsrklngl rdkqsgktil dflksdqfan rfnqlihdd sitfkediqk aqvsgqgdsl
721 hehianlagn paikkqilqt kvvdvlkvk zgrhkperiv lemardqrrt qkqeknarer
781 mkrieegike lgsqllkchp ventqlqnek lylyylqngq dmyvdqeldi nrlsdyfvdh
841 ivpqsflkad eidnkvltrs dkfraksdny pseevkkmk nywrqlinak litqrkfdnl
901 tkaergglse ldkagfikrq ivetrqitkh vaqlldsrn tkydendkil revkvitika
961 klvdfrkdf qfykvreinn yhhahdaylp avvgtalikk ypklesefvy gdykvdyvrk
1021 miakseqeig katakyffys nimffktei tlangeirkr plietngotg eivwdqgrdf
1081 atvrkvlamp qvnlvkktev qtqgsakesi lprknsdkli arkkdwqpkk yqgfdspva
1141 ysvlvvakvo kgkskkkksv kelligitime rsefcknpid fleakgykev kkdliiklpk
1201 yslfelengr krmlasagel qkgnelalps kyvnflylas hyeklkgspe dneqkqlfve
1261 qhkhyldeii eqisefskrv iladanidkv lsaynkhrdk pireqaenii hiftitniga
1321 paafkyfdtt idrkrytsk evldatlihq sitglyetri disqlggd

```

Мотив 1

Домен 1

Мотив 2

Мотив 3

Домен 2

Мотив 4

Фиг. 1

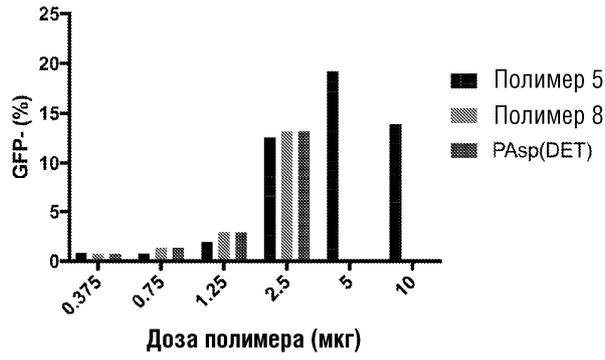
Francisella tularensis subsp. *novicida* U112 Cpf1

```

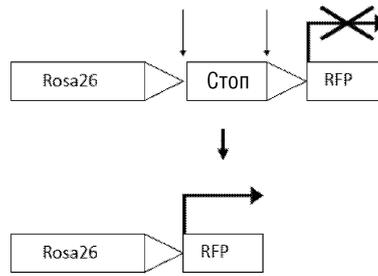
1 msiygefvnk yslsktrife lipqgktilen ikarglildd ekrakdykka kqiidkyhqf
61 fieeilssvc isedllqyns dvyfklkksd ddnlqkdfks akdtikkqis eyikdsefkf
121 nlfngnlida kkgqesdlil wlkqskdngi elfkansdit didealeiik sfkgwttyfk
181 gfhenrknyv ssndiptsii yrivddnlpk flenkakyes lkdkapeain yeqikkdlae
241 eltfdidykt sevnqrvfsl devfeianfn nylngsgitk fntiiggkfv ngentkrkgi
301 neyinlysqq indktlkkyk msvlfkqils dtesksfvid kleddsdvvt tmqsfyeqia
361 afktveeksi ketlslfdd lkaqkldlsk iyfkndkslt dlsqqvfddy svigtavley
421 itqaiapknl dnpskkeqel iakktekaky lsletiklal eefnkhrdid kqcrfeella
481 nfaaipmifd eiaqnkdnla qisikyqngq kkdllqasae ddvkaikdli dqtnnllhkl
541 kifhisqsed kanildkdeh fylvfeecyf elanivplyn kirnyitqkp ysdekfklnf
601 enstlangwd knkepntai lfikddkyul gvmnkknki fddkaikenk gegykkivyk
661 llpgankmlp kvffsaksik fynpsedilr irnhsthtkn gspqkyekf efniedcrkf
721 idfykqsisk hpewkdfgfr fsdtqrynsi defyrevenq gykltfenis esyidsvvnq
781 gklylfqiyn kdfsayskgr pnhtlywka lfdernlqdv vykingeael fyrkqsipk
841 ithpakeala nknkdnpkel svfeydlikd krftedkfff hcpitinfks sgankndei
901 nlllkekand vhilsidрге rhlayytlvd gkgniikqdt fniigndrmk tnyhdklaai
961 ekdrdsarkd wkkinnikem keyylsqvvh eiaklvieyn aivvfedlnf gfkqrgrkve
1021 kqvyyklekm lieklnylvf kdnefdktgg vlayqltap fetfkkmgkq tgiyyvpag
1081 ftskicpvtg fvnqlypkye svksqeffs kfdkicynld kgyfefsfdy knfgdkaakg
1141 kwttiasfgsr linfrnsdkn hnwdtrevyp tkeleklikd ysieyghgec ikaaicgesd
1201 kkffakltsv lntilqmrns ktgteldyli spvadvngnf fdsrqapknn pqdadangay
1261 higlkgllml griknnqegk klnlviknee yfefvqnrnn

```

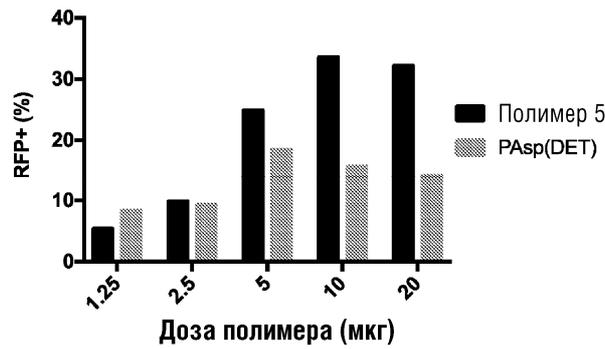
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

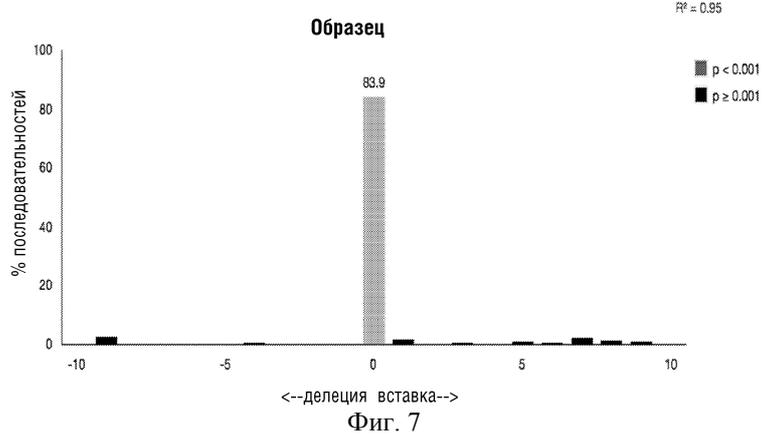


Фиг. 5

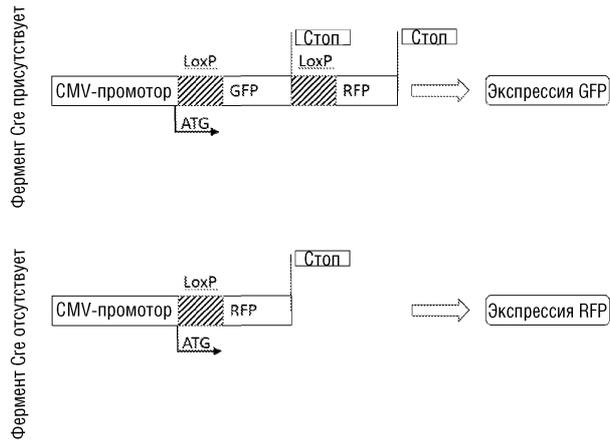


Фиг. 6

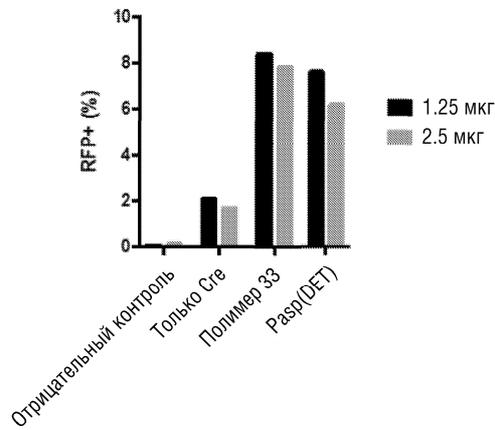
Общая эффективность = 11,0%



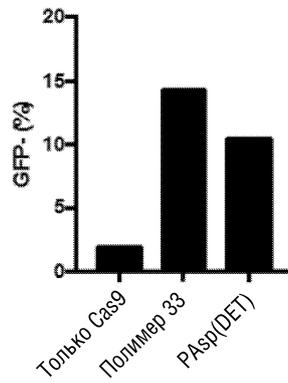
Фиг. 7



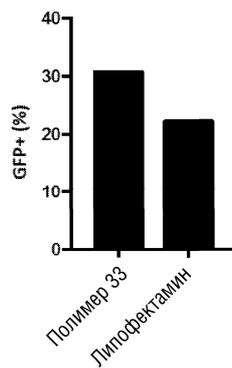
Фиг. 8



Фиг. 9

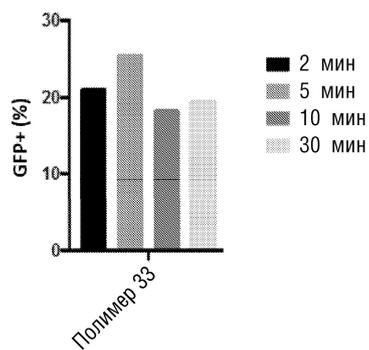


Фиг. 10

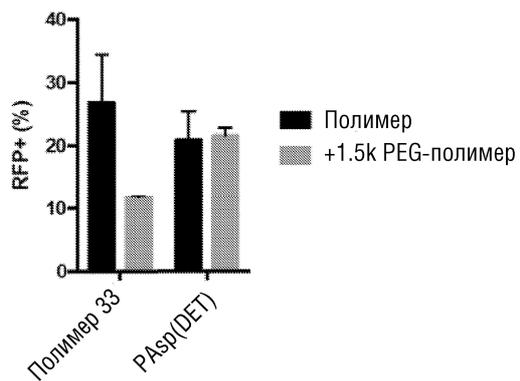


Фиг. 11

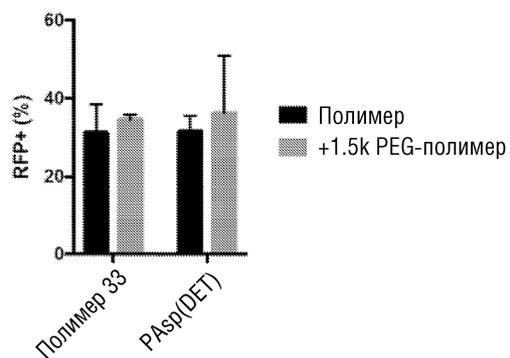
046334



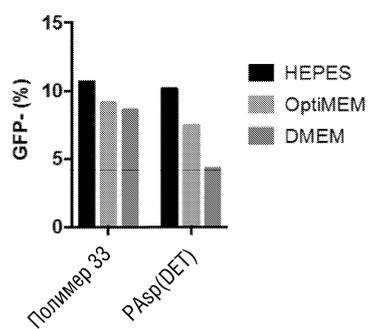
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

AsCpfl

```

1 mtqfegftnl yqvsktlrfe lipqgkltkh iqegqfieed karndhykel kpiidriykt
61 yadqclqlvq ldwenlsaai dsyrkektee trnalieega tyrnaihdyf igrtdnltda
121 inkraehyik glfkaelfng kvlkqlgtvt ttehenalir sfdkfttyfs gfyenrknvf
181 saedistaip hriyqdnfpk fkenchiftr litavpslre hfenvkkaig ifvstsieev
241 fsfpfyngll tqtqidlyng llggisreag tekikglnev lnlaiqknde tahiaslph
301 rfiplfkqil sdrntlsfil eefksdeevi qsfckyktll rnenvletae alfnelnsid
361 lthifishkk letissalcd hwdtlrnaly erriselgtk itksakekvq rslkhednl
421 qeiisaagke lseafkqkts eilshahaal dqplpttlkk qeekilksg ldsilglyhl
481 ldwfavdesn evdpefsarl tgiklemeps lsfynkarny atkpkysvek fklngmptl
541 asgwvknkek nngailfvkn glyylgimpk qkgrykalsf eptektsegf dkmydyfdp
601 aakmipkcest qlkavtahfq thttpillsn nfiepleitk eiydlinnpek epkkfqtaya
661 kktgdqkgyr ealckwidft rdfsksyktk tsidlsslrp ssqykdlgey yaelplyh
721 isfqriaeke imdavetgkl ylfqiynkdf akghhgkpln htlywtgifs penlaktsik
781 lngqaelfyr pksrmkrmah rlgekmlnk lkdgktpdp tlyqelydyv nhrishdlsd
841 earallpnvi tkevsheikk drrftsdkff fhvpitlyng aanspskfnq rvnaylkhep
901 etpliigdrq ernliyitvi dstgkileqr slntiqqfdy qkkldnreke rvaarqawsv
961 vgtikdklqg ylsqviheiv dlmihyqavv vlenlnfgfk skrtgiaeka vyqqfekmli
1021 dklncvlkld ypaekvggv l npyqltdqft sfakmgtqsg flfyvppayt skidpltqfv
1081 dpfvwktikn hesrkhfleg fdflyhdvkt gdfilhfkmn rnlsgqrglp gfm pawdivf
1141 eknetqfdak gtpfiagkri vpvienhrft gryrdlypan elialleekg ivfrdgsnil
1201 pkllenddash aidtmvalir svlqmrsna atgedyinsp vrldngvcfd srfqnpewpm
1261 dadangayhi alkqgllnh lkeskdlklq ngisnqdwia yiqelrn

```

Фиг. 16

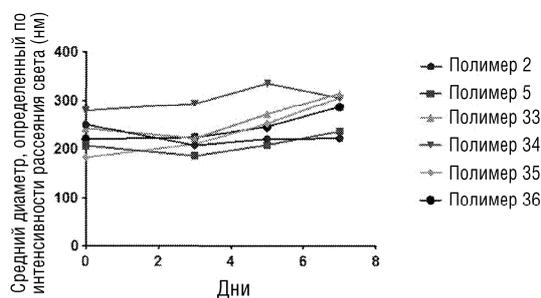
LbCpfl

```

AASKLEKFTNCYSLSKTLRFKAI PVGKTOENIDNKRLLEVEDEKRAEDYKGVKLLDRYYL
SPINDVLHS IKLKNLNNYISLFRKKTRETEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGAAGYKSLF
KKDIIETILPEAADDKDEIALVNSFNFTTAFTGFFDNRENMFSEEAKSTSI AFR CINEN
LTRYISNMDIFEKVDAIFDKHEVQEI KEKILNSDYDVEDFFECEFFNFVLTQEGIDVYNA
IIGGFVTESEGEKIKGLNEYINLYNAKTKQALPKFKPLYKQVLS DRESLSFYGEGYTSDEE
VLEVFRNTLNKNS EIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGIFVKNGPAISTISKDIFGEWNLIR
DKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDDRRSFKKIGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLEKII I
QKVDEIYKVVYGSSEKLFADFDVLEKSLKNDAVVAIMKDLLDSVKS FENYIKAFFGEGKE
TNRDESYGDFVLA YDILLKVDHIYDAIRNYVTQKPYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDK
TDYRATILRYGSKYYLA IMDKRYAKCLQKIDKDDVNGNYEK INYKLLPGPNKMLPKVFFS
KKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFKKGDMFNLDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSE
TEKYKDIAGFYREVEEQGYKVSFESASKKEVDKLV EEGKLYMFQIYNKDFSDKSHGTPNL
HTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRASLKEELV VHPANSPIANKNPDNPKTTTL
SYDVYKDRFSEDOYELHIP IAINKCPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPNYVIGIDRCERNLL
YIVVVDGKGNIVEQYSLNEI INNFGIRIKTDYHSLLDKKEKERFEARQNWTSI ENIKEL
KAGYISQVVKICELVEKYDAVIALEDLNSGFKN SRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLN YMVD
KKSNPCATGGALKGYQITNK FESFKSMSTONGFIFYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYT
SIADSKKFISSFD RIMYVPEEDLFEFALDYKNFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFA AAK
KNNVFAWEVCLTSAYKELFNKYGINYQOQDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLMLQMRN
SITGRTD VDFLISPVKNSDGIYD SRNYEAQENAILPKNADANGAYNIARKVLWAIGQFK
KAEDEKLDKVKIAISNKEWLEYAQT SVK

```

Фиг. 17



Фиг. 18



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2