

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047582**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.08

(21) Номер заявки
202090892

(22) Дата подачи заявки
2018.10.02

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННАЯ НАПРАВЛЯЮЩАЯ РНК CRP1

(31) 62/567,123; 62/617,138; 62/697,327

(32) 2017.10.02; 2018.01.12; 2018.07.12

(33) US

(43) 2020.08.06

(86) PCT/US2018/054027

(87) WO 2019/070762 2019.04.11

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

(72) Изобретатель:
Ли Кунвоо (US)

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

(56) CN-A-106244591

RONGFANG XU ET AL.: "Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system", LANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 15, no. 6, 1 June 2017 (2017-06-01), pages 713-717, XP055530604, GB, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/pbi.12669, figure 1

BIN LI ET AL.: "Engineering CRISPR-Cpf1 crRNAs and mRNAs to maximize genome editing efficiency", NATURE BIOMEDICAL ENGINEERING, vol. 1, no. 5, 10 May 2017 (2017-05-10), page 0066, XP055530506, DOI: 10.1038/S41551-017-0066, page 2 - page 3; figure 1

YING DANG ET AL.: "Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency", GENOME BIOLOGY, vol. 16, no. 280, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 1-10, XP055369116, DOI: 10.1186/S13059-015-0846-3, figure 1

BERND ZETSCHKE ET AL.: "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", CELL, vol. 163, no. 3, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 759-771, XP055267511, AMSTERDAM, NL, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей cr-РНК Cpf1, последовательность процессинга у 5'-конца cr-РНК Cpf1 и последовательность удлинения у 5'-конца последовательности процессинга. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, носитель и, необязательно, Cpf1. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу генетической модификации эукариотической клетки-мишени, включающему контактирование эукариотической клетки-мишени с нуклеиновой кислотой или с композицией для генетической модификации нуклеиновой кислоты-мишени в клетке.

B1

047582

047582 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей патентной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/567123, поданной 2 октября 2017 г.; предварительной заявки на патент США № 62/617138, поданной 12 января 2018 г., и предварительной заявки на патент США № 62/697327, поданной 12 июля 2018 г., содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Предпосылки создания изобретения

Было подтверждено, что РНК-зависимые эндонуклеазы оказались эффективным инструментом для геномного конструирования клеток и микроорганизмов множества типов. РНК-зависимые эндонуклеазы создают сайт-специфические двухцепочечные ДНК-разрывы или одноцепочечные ДНК-разрывы в нуклеиновых кислотах-мишенях. При расщеплении нуклеиновой кислоты-мишени внутри клетки, разрыв в нуклеиновой кислоте может быть репарирован путем негомологичного присоединения концов (NHEJ) или прямой гомологичной репарации (HDR).

Прямая доставка РНК-зависимых эндонуклеаз и их компонентов для редактирования генов (например, направляющей РНК) в клетки как *in vitro*, так и *in vivo* обладает огромным потенциалом как терапевтической стратегия лечения генетических заболеваний. Однако, в настоящее время, прямая доставка этих компонентов в клетки с приемлемой эффективностью является сложной задачей.

Следовательно, существует необходимость в идентификации новых композиций и в разработке соответствующих способов улучшения доставки РНК-зависимых эндонуклеаз в клетки и улучшения других свойств этих эндонуклеаз, которые позволили бы усовершенствовать конструирование генома. Настоящее изобретение относится к таким композициям и к способам, связанным с этими композициями.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, состоящей из *cg*-РНК *Cpf1* с последовательностью удлинения. В одном аспекте изобретения, нуклеиновая кислота содержит *cg*-РНК *Cpf1* и последовательность удлинения у 5'-конца *cg*-РНК *Cpf1*, где последовательность удлинения содержит менее, чем приблизительно 60 нуклеотидов. В другом аспекте изобретения, нуклеиновая кислота содержит *cg*-РНК *Cpf1*, последовательность процессинга у 5'-конца *cg*-РНК *Cpf1* и последовательность удлинения у 5'-конца последовательности процессинга. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей нуклеиновую кислоту, носитель и, необязательно, белок *Cpf1* или вектор, кодирующий этот белок.

Настоящее изобретение также относится к способу генетической модификации эукариотической клетки-мишени. Этот способ включает контактирование эукариотической клетки-мишени с нуклеиновой кислотой, содержащей *cg*-РНК *Cpf1*, как описано в настоящей заявке.

Эти и другие аспекты изобретения описаны более подробно в нижеследующих разделах.

Краткое описание некоторых изображений на чертеже(ах)

На фиг. 1А представлен график для сравнения доставки немодифицированной *cg*-РНК в комплексе с *Cpf1* с использованием липофектамина или посредством электропорации (нуклеофекции).

На фиг. 1В и 1С представлены графики для сравнения доставки, опосредуемой липофектаминами, и NHEJ-генерирования комплексов *Cpf1*-*cg*-РНК, содержащих немодифицированную *cg*-РНК (длиной в 41 нуклеотид) и удлиненную *cg*-РНК.

На фиг. 1D схематически проиллюстрированы структуры немодифицированной *cg*-РНК длиной в 41 нуклеотид (нк) и удлиненных *cg*-РНК. Стрелками показаны сайты расщепления *Cpf1*.

На фиг. 1E представлен график, иллюстрирующий эффективность NHEJ для создания конструкций *cg*-РНК, проиллюстрированных на фиг. 1D.

На фиг. 1F представлен график, изображающий доставку RNP *Cpf1* в клетки с использованием липофектамина и *cg*-РНК с различными длинами, меченных флуоресцентным красителем.

На фиг. 2 представлен график (правая панель), на котором проиллюстрирована эффективность редактирования генов в зависимости от нокдауна GFP для 5'-удлиненной *cg*-РНК, доставляемой в клетки GFP-НЕК посредством электропорации, и схематически проиллюстрирована *cg*-РНК (левая панель).

На фиг. 3А схематически проиллюстрированы исследования *in vivo* на мышах A19.

На фиг. 3В схематически проиллюстрированы участок инъекции в икроножную мышцу и срезы для визуализации.

На фиг. 4А представлен график частоты HDR для *cg*-РНК с различными удлинениями, доставляемыми донорной ДНК посредством электропорации.

На фиг. 4В представлен график, где указаны проценты GFP-клеток для *cg*-РНК с различными удлинениями, доставляемыми донорной ДНК, и где проиллюстрирована эффективность NHEJ, проводимого посредством электропорации.

На фиг. 4С представлен график, где указаны проценты BFP-клеток для *cg*-РНК с различными удлинениями, доставляемыми донорной ДНК, и где проиллюстрирована эффективность NHEJ, проводимого посредством электропорации.

На фиг. 4D представлен график, где указаны проценты GFP-клеток для удлиненной *cg*-РНК, доставленной посредством электропорации с использованием одноцепочечной ДНК (оцДНК) и без нее в отсутствие гомологии последовательности-мишени.

На фиг. 4E представлен график, иллюстрирующий редактирование генов, выраженное как процент GFP-клеток для sg-РНК, удлинённой на 100 нуклеотидов и 9 нуклеотидов посредством электропорации без гомологии последовательности-мишени.

На фиг. 4F представлен график, иллюстрирующий процентное содержание GFP-клеток для sg-РНК с удлинением в 4 нуклеотида и без такого удлинения, где указанная sg-РНК была дополнительно модифицирована химической группой посредством электропорации.

На фиг. 5A и 5B схематически проиллюстрировано конъюгирование sg-РНК и донорной ДНК.

На фиг. 5C представлены изображения гель-электрофоретического разделения, иллюстрирующие высвобождение донорной ДНК и sg-РНК из конъюгированной молекулы sg-РНК/ДНК после восстановления тиолами.

На фиг. 6 представлен график, на котором продемонстрировано, что Cpf1, конъюгированный с HD-РНК, индуцирует NHEJ в клетках GFP-НЕК после трансфекции PAsp(DET) (то есть катионным полимером).

На фиг. 7 представлен график, на котором продемонстрировано, что Cpf1, конъюгированный с HD-РНК, индуцирует HDR в клетках GFP-НЕК после трансфекции PAsp(DET) (то есть катионным полимером).

На фиг. 8 представлена последовательность белка Cpf1.

На фиг. 9 представлены примеры последовательностей процессинга Cpf1.

На фиг. 10A схематически проиллюстрирована sg-РНК, конъюгированная с донорной ДНК.

На фиг. 10B проиллюстрированы последовательности, используемые в sg-РНК, конъюгированной с донорной ДНК.

На фиг. 10C представлен график, где указаны проценты RFP⁺-клеток после обработки различными sgRNA и Cpf1 посредством электропорации в первичных миобластах Ai9.

На фиг. 10D представлен график, где указаны проценты RFP-клеток, трансфицированных ДНК или РНК из 100 нуклеотидов в первичные миобласты Ai9.

На фиг. 10E представлен график, иллюстрирующий эффективность NHEJ в клетках HepG2, трансфицированных RNP Cpf1 с удлинением в 9 нуклеотидов или без него на гене *Serpinal*, нацеленном на sg-РНК, посредством электропорации.

На фиг. 11A представлены структуры РНК, которые могут быть использованы для удлинения sg-РНК.

На фиг. 11B проиллюстрированы тринуклеотидные повторы, которые могут быть использованы для получения различных структур РНК.

На фиг. 11C проиллюстрировано пересечение гибридизующихся последовательностей удлинения sg-РНК в контактирующей петле, которая может быть использована для образования мультимеров sg-РНК.

На фиг. 11D проиллюстрировано пересечение гибридизующихся последовательностей удлинения sg-РНК с образованием тримеров (панель (i)) или октамеров (панель (ii)).

На фиг. 12 показана эффективность редактирования (% BPF) различных sg-РНК Cpf1 в BFP-экспрессирующих клетках HEK293T. MS представляет собой 2'-ОМе-3'-фосфориоатные модификации на первых трех нуклеотидах с 5'-конца, +9du означает 2'-дезокси-модификацию на 9-м нуклеотиде с 5'-конца, +9S означает фосфориоатные модификации на первых 9 нуклеотидах с 5'-конца. Эффективность нокаута BFP измеряли с помощью проточной цитометрии через 7 дней после электропорации. Среднее \pm ср. кв. ош., n=3. Все удлинённые sg-РНК статистически значимо отличаются от немодифицированной sg-РНК со значением p менее, чем 0,05 по t-критерию Стьюдента.

На фиг. 13A проиллюстрированы немодифицированные оцрРНК Cas9 и sg-РНК Cpf1.

На фиг. 13B и 13C представлены графики, иллюстрирующие относительную активность оцрРНК Cas9 и sg-РНК Cpf1 в зависимости от нокаута GFP.

На фиг. 14 схематически представлена удлинённая sg-РНК, модифицированная биотином и авидином и связанная с нацеливающей молекулой, содержащей биотин.

На фиг. 15A схематически проиллюстрированы химические модификации, вводимые для получения удлинённых sg-РНК.

На фиг. 15B представлен график, где показана количественная оценка остаточного количества sg-РНК после инкубирования в сыворотке.

На фиг. 15C представлен график процентного содержания GFP-клеток после доставки sg-РНК с удлинением в 9 нуклеотидов и химической модификации с использованием липофектамина.

На фиг. 15D представлен график для сравнения процентов GFP-клеток после доставки удлинённой sg-РНК с химическими модификациями и немодифицированной удлинённой sg-РНК вместе с Cpf1 посредством электропорации.

На фиг. 16 представлен график для сравнения доставки, опосредованной катионным полимером, и NHEJ-генерирования комплексов Cpf1-sg-РНК, содержащих немодифицированную sg-РНК (41 нуклеотид), sg-РНК, удлинённую на 9 пар оснований (всего 50 нуклеотидов) или sg-РНК, удлинённую на 59 пар оснований (всего 100 нуклеотидов).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к модифицированной направляющей нуклеиновой кислоте для Cpf1, называемой "сг-РНК", с улучшенными свойствами по сравнению с обычными молекулами сг-РНК. Используемый здесь термин "сг-РНК" означает последовательность нуклеиновой кислоты (например, РНК), которая связывается с РНК-зависимой эндонуклеазой Cpf1 и доставляет РНК-зависимую эндонуклеазу в конкретное положение в нуклеиновой кислоте-мишени, расщепляемой Cpf1. Cpf1 представляет собой РНК-зависимую эндонуклеазу системы CRISPR/Cas класса II, которая участвует в создании адаптивного иммунитета типа V. Cpf1 не требует присутствия молекулы tracr-РНК, как и другие ферменты CRISPR, и для ее функционирования требуется только одна молекула сг-РНК. Cpf1 предпочитает мотив РАМ "TTN", который расположен выше мишени со стороны 5'-конца. Кроме того, сайты разрезания Cpf1 расположены в шахматном порядке приблизительно с интервалами в 3-5 оснований, которые создают "липкие концы" (Kim et al., 2016. "Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells" published online June 06, 2016). При этом, предполагается, что эти липкие концы с выступающими 3-5 п.о. облегчают NHEJ-опосредованное лигирование и улучшают редактирование генов фрагментов ДНК с совпадающими концами.

Специалистам в данной области очевидно, что сг-РНК Cpf1 может происходить от любого вида или любого синтетического или природного варианта или ортолога, полученного или выделенного из любого источника. То есть, считается, что сг-РНК Cpf1 может иметь необходимые элементы (например, последовательность или структуру) сг-РНК, которая распознается (связывается с) любым полипептидом Cpf1 или ортологом бактерий любого вида или их синтетическими вариант/ами. Примеры последовательностей сг-РНК Cpf1 представлены на фиг. 9, и таким образом, примеры сг-РНК Cpf1 включают, например, последовательности, содержащие любую из SEQ ID NO: 21-39. Примером последовательности сг-РНК Cpf1 синтетического варианта Cpf1 является сг-РНК, соответствующая ортологу MAD7 Cpf1 от Inscripta, Inc. (CO, USA). Другим примером варианта Cpf1 является Cpf1, модифицированный для снижения или устранения РНКазной активности, например, путем введения модификации в H800A, K809A, K860A, F864A и R790A Acidaminococcus Cpf1 (AsCpf1) или в соответствующее положение другого ортолога Cpf1 (например, мутации H800A или замены H→A в соответствующем положении).

Обычно, сг-РНК содержит нацеливающий домен и домен "стебель-петля", расположенный у 5'-конца нацеливающего домена. Общая длина сг-РНК не имеет конкретных ограничений, при условии, что она будет направлять Cpf1 в конкретное положение в нуклеиновой кислоте-мишени. Домен "стебель-петля" обычно имеет длину приблизительно 19-22 нуклеотидов (нк), а нацеливающий/направляющий домен имеет длину приблизительно 14-25 нуклеотидов (например, по меньшей мере приблизительно 14 нуклеотидов, 15 нуклеотидов, 16 нуклеотидов, 17 нуклеотидов или 18 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления изобретения, общая длина сг-РНК Cpf1 может составлять от 20 до 100 нуклеотидов, от 20 до 90 нуклеотидов, от 20 до 80 нуклеотидов, от 20 до 70 нуклеотидов, от 20 до 60 нуклеотидов, от 20 до 55 нуклеотидов, от 20 до 50 нуклеотидов, от 20 до 45 нуклеотидов, от 20 до 40 нуклеотидов, от 20 до 35 нуклеотидов, от 20 до 30 нуклеотидов или от 20 до 25 нуклеотидов.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей сг-РНК Cpf1, последовательность удлинения у 5'-конца сг-РНК и, необязательно, последовательность процессинга, которая может быть расположена между сг-РНК и последовательностью удлинения, в последовательности удлинения или у 5'-конца последовательности удлинения.

Последовательность удлинения.

Нуклеиновая кислота согласно изобретению содержит последовательность удлинения, расположенную у 5'-конца сг-РНК. Последовательность удлинения может содержать любую комбинацию нуклеиновых кислот (то есть любую последовательность). В одном варианте осуществления изобретения, последовательность удлинения увеличивает общую плотность отрицательного заряда молекулы нуклеиновой кислоты и улучшает доставку нуклеиновой кислоты, включающей сг-РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность удлинения может быть отщеплена в клетке один раз. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, авторы лишь предполагают, что Cpf1 может расщеплять последовательность удлинения. Однако, в некоторых применениях желательно использовать конструкцию, в которой последовательность удлинения не отщепляется от сг-РНК Cpf1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность удлинения не расщепляется сг-РНК Cpf1. Так, например, последовательность удлинения или некоторая ее часть или область могут содержать одну или более модифицированных межнуклеотидных связей (модифицированный "остов"), которые являются устойчивыми к расщеплению посредством Cpf1 сг-РНК (например, резистентными к нуклеазе). Примеры модифицированных межнуклеотидных связей включают, но не ограничиваются ими, фосфортиоатные, фосфордифитоатные, метилфосфонатные, фосфорамидатные связи, 2'-О-метильные связи, 2'-О-метоксиэтильные связи, 2'-фторсодержащие связи, мостиковую нуклеиновую кислоту (BNA) или модифицированные фосфотриэфирные связи, а также их комбинации. Последовательность удлинения или ее часть также может содержать синтетические нуклеотиды, такие как ксенонуклеиновые кислоты (XNA), которые являются резистентными к нуклеазам. XNA представляют собой нуклеиновые кислоты, в которых рибофуранозное кольцо ДНК

или РНК заменено пяти- или шестичленными модифицированными молекулами рибозы, такими как 1,5-ангидрогексит-нуклеиновые кислоты (HNA), циклогексенил-нуклеиновые кислоты (CeNAs) и 2'4'-C-(N-метиламинометил)-мостиковые нуклеиновые кислоты (BNA), 2'-O, 4'-C-метил-β-D-рибонуклеиновые кислоты или блокированные нуклеиновые кислоты (LNA), ANA (арабинонуклеиновые кислоты), 2'-фторарабинонуклеиновая кислота (FANA) и α-L-треофуранозильные нуклеиновые кислоты (TNA). Кроме того может быть также использована любая их комбинация.

Длина последовательности удлинения не имеет конкретных ограничений, при условии, что эта последовательность удлинения будет повышать общую плотность отрицательного заряда. Так, например, последовательность удлинения может иметь длину по меньшей мере приблизительно от 2 нуклеотидов (нк) до приблизительно 1000 нуклеотидов (например, по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 и приблизительно до 1000 нуклеотидов). В одном аспекте изобретения, последовательность удлинения имеет длину не более, чем приблизительно 100 нуклеотидов, например не более, чем приблизительно 80 нуклеотидов, не более, чем приблизительно 60 нуклеотидов или не более, чем приблизительно 40 нуклеотидов (например, не более, чем приблизительно 30 нуклеотидов или не более, чем приблизительно 20 нуклеотидов). Любые из вышеуказанных нижних и верхних пределов длины могут быть выражены как интервалы длин. Могут быть также использованы и более короткие последовательности (например, не более, чем приблизительно 15 нуклеотидов или не более, чем приблизительно 10 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность удлинения содержит по меньшей мере приблизительно 2 нуклеотида, например, по меньшей мере приблизительно 4 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно 6 нуклеотидов или даже, по меньшей мере приблизительно 9 нуклеотидов. Любые из вышеуказанных значений могут быть представлены в виде интервалов. Так, например, последовательность удлинения может составлять приблизительно 2-60 нуклеотидов (например, приблизительно 2-40 нуклеотидов, приблизительно 2-30 нуклеотидов, приблизительно 2-20 нуклеотидов, приблизительно 2-15 нуклеотидов или приблизительно 2-10 нуклеотидов), приблизительно 4-60 нуклеотидов (например, приблизительно 4-40 нуклеотидов, приблизительно 4-30 нуклеотидов, приблизительно 4-20 нуклеотидов, приблизительно 4-15 нуклеотидов или приблизительно 4-10 нуклеотидов); приблизительно 6-60 нуклеотидов (например, приблизительно 6-40 нуклеотидов, приблизительно 6-30 нуклеотидов, приблизительно 6-20 нуклеотидов, приблизительно 6-15 нуклеотидов или приблизительно 6-10 нуклеотидов); или приблизительно 9-60 нуклеотидов (например, приблизительно 9-40 нуклеотидов, приблизительно 9-30 нуклеотидов, приблизительно 9-20 нуклеотидов, приблизительно 9-15 нуклеотидов или приблизительно 9-10 нуклеотидов).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность удлинения не выполняет какой-либо другой функции, кроме сообщения большей общей плотности отрицательного заряда конструкции нуклеиновой кислоты. В этом варианте осуществления изобретения, например, последовательность удлинения представляет собой рандомизированную или некодирующую последовательность. В некоторых случаях, например, при использовании последовательности процессинга, последовательность может разрушаться после расщепления последовательности процессинга и высвобождения из конструкции нуклеиновой кислоты.

В других вариантах осуществления изобретения, последовательность удлинения выполняет отдельную функцию и не связана с сообщением большей общей плотности отрицательного заряда конструкции нуклеиновой кислоты. Последовательность удлинения может иметь любую дополнительную функцию. Так, например, последовательность удлинения может поставлять сайт гибридизации для другой нуклеиновой кислоты, такой как донорная нуклеиновая кислота. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность удлинения может представлять собой аптамер и/или может стимулировать связывание клеток. Однако, иногда нежелательно стимулировать рекрутинг связывания белков, не являющихся РНК-зависимой эндонуклеазой, с направляющей РНК. Кроме того, последовательности аптамеров обычно имеют сложные паттерны укладки, которые могут быть громоздкими и не компактными. Таким образом, в других вариантах осуществления изобретения, последовательность удлинения не является последовательностью аптамера.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность удлинения может содержать последовательность, кодирующую белок, экспрессия которого желательна в клетке-мишени, подлежащей редактированию. Так, например, последовательность удлинения может содержать последовательность, кодирующую РНК-зависимую эндонуклеазу, такую как РНК-зависимая эндонуклеаза, которая спаривается с сг-РНК (то есть распознает ее и регулируется ею), используемой в конструкции нуклеиновой кислоты. Последовательность удлинения может включать, например, последовательность мРНК РНК-зависимой эндонуклеазы.

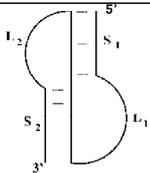
В некоторых вариантах осуществления изобретения, удлинение подвергается самоукладке (самогибридизации) с последующим структурированным удлинением. Тип структуры не имеет конкретных ограничений. Удлинение может иметь структуру случайной спирали, однако, в некоторых вариантах изобретения, удлинение имеет структуру, которая является более компактной, чем структура случайной

спирали с таким же количеством нуклеотидов, которая обеспечивает большую плотность отрицательного заряда. При увеличении общей длины последовательности удлинения, отрицательный заряд молекулы увеличивается. При использовании более компактной структуры, общая плотность отрицательного заряда молекулы также увеличивается. Компактность или плотность заряда могут быть определены по подвижности в гель-электрофорезе. Более конкретно, если гель-электрофорез осуществляют для двух нуклеиновых кислот с одинаковым количеством нуклеотидов, проходящих вместе на одном и том же геле, то считается, что нуклеиновая кислота с более высокой подвижностью (которая перемещается в геле дальше всех) имеет более компактную структуру.

В другом варианте осуществления изобретения, последовательность удлинения содержит по меньшей мере одну полустабильную шпилечную структуру, стабильную шпилечную структуру, структуру псевдоузла, структуру G-квадруплекса, структуру выпуклой петли, структуру внутренней петли, структуру разветвленной петли или их комбинацию. Эти типы нуклеотидных структур известны специалистам в данной области и схематически показаны на фиг. 11А. Следует отметить, что эти изображения приводятся лишь в целях иллюстрации общей структуры и не должны рассматриваться как детальная иллюстрация фактической молекулярной структуры. Специалистам в данной области известно, что шпилечная структура, например, может иметь промежуточные некомплементарные области, которые создают "выпуклости" или другие изменения в структуре, и что другие изображенные структуры могут включать аналогичные варианты. Структура данной нуклеотидной последовательности может быть определена с использованием доступных алгоритмов (см., например, Web-сервер "The mfold Web Server", имеющийся в Политехническом Институте "Rensselaer Polytechnic Institute" и в Институте "RNA Institute, College of Arts and Sciences, State University of New York at Albany"; см. также M. Zuker, D. H. Mathews & D. H. Turner. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski and B. F. C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999)).

Тип представленной структуры можно регулировать с использованием повторяющегося тринуклеотидного мотива (см., например, фиг. 11В). Повторяющийся тринуклеотидный мотив представляет собой мотив из трех нуклеотидов, который повторяется в последовательности по меньшей мере дважды (например, повторяется два или более раз, три или более раз, четыре или более раз, пять или более раз, шесть или более раз, семь или более раз, восемь или более раз или десять или более раз). Таким образом, последовательность удлинения может содержать повторяющийся тринуклеотидный мотив. В одном варианте осуществления изобретения, последовательность удлинения содержит повторяющийся тринуклеотидный мотив CAA, UUG, AAG, CUU, CCU, CCA, UAA или их комбинации, которые создают последовательность случайной спирали. В другом варианте осуществления изобретения, последовательность удлинения содержит повторяющийся тринуклеотидный мотив CAU, CUA, UUA, AUG, UAG или их комбинации, которые создают полустабильную шпилечную структуру. В другом варианте осуществления изобретения, последовательность удлинения содержит повторяющийся тринуклеотидный мотив CNG (например, CGG, CAG, CUG, CCG), повторяющийся тринуклеотидный мотив CGA или CGU или их комбинацию, которые создают стабильную шпилечную структуру. В другом варианте осуществления изобретения, последовательность удлинения содержит повторяющийся тринуклеотидный мотив AGG, UGG или их комбинации, которые создают квадруплексную (или G-квадруплексную) структуру. В еще одном варианте осуществления изобретения, последовательность удлинения содержит комбинацию вышеупомянутых тринуклеотидных мотивов и комбинацию различных структур, полученных таким образом. Так, например, последовательность удлинения может иметь область, содержащую структуру случайной спирали; область, содержащую полустабильную шпильку; область, содержащую стабильную шпильку; и/или область, содержащую квадруплекс. Таким образом, каждая область может содержать повторяющийся тринуклеотидный мотив, связанный с указанной структурой. Неограничивающие примеры таких структур представлены ниже в таблице.

Таблица 1
 Репрезентативные удлиненные последовательности РНК (35 нуклеотидов)
 и их соответствующие структуры

	Последовательности (5'→3')
Случайная спираль 	R1: UCCCCGAGCUGUGCUUCGUUUCUACACUUGUACAU G R2: CCCUGCGACAGUCAUCUCGGCCGCCAAAGACACA G R3: UUCGUCGCCUUGGGCCGUCGUUUUUCGCUC GUGGG
Псевдоузел 	S1: UUGGCGCAGUGGGCUAGCGCCACUCAAAAGGCC A
Квадруплекс 	S2: UUAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA GG
Шпилька 	S3: UUCGUCGUCGUCGUCGUCGUCGUCGUCGUCGUCGUC U S4: UUCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCU G

Последовательность удлинения может быть также использована для создания мультимеров *cr*-РНК; и таким образом, в другом своем варианте, настоящее изобретение относится к мультимеру *cr*-РНК, содержащему две или более молекул *cr*-РНК (например, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, или даже 8 или более молекул *cr*-РНК), где каждая *cr*-РНК содержит описанную здесь последовательность удлинения, и молекулы *cr*-РНК мультимера связаны своими последовательностями удлинения, например, посредством спаривания оснований или посредством гибридизации. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения, каждая *cr*-РНК мультимера содержит последовательность удлинения, содержащую область, достаточную комплементарную области удлинения другой *cr*-РНК мультимера, что облегчает гибридизацию. Комплементарная область может иметь любую подходящую длину для облегчения взаимодействия (например, 4 нуклеотида или более, 6 нуклеотидов или более, 8 нуклеотидов или более, 10 нуклеотидов или более, 15 нуклеотидов или более и т.п.).

Мультимеры *cr*-РНК являются подходящими, например, для доставки нескольких *cr*-РНК одновременно, например, если для конкретных терапевтических стратегий желательно использовать множество *cr*-РНК.

Одним из примеров такого использования является пропуск экзонов, при котором фрагмент ДНК расщепляется двумя *cr*-РНК с восстановлением функциональной рамки считывания (например, Ousterout DG, et al. (2015), Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne Muscular Dystrophy. Nat Commun. 6:6244). Для пропуска экзона требуются две *cr*-РНК, каждая из которых нацелена на различные сайты (одна на 5'-сайт, а другая на 3'-сайт) в ядре для нацеливания. В идеальном случае, отношение двух *cr*-РНК должно составлять 1:1; однако, такое отношение трудно поддерживать. При спаривании *cr*-РНК (например, каждая из которых содержит различные нацеливающие последовательности) в мультимерах посредством соответствующих структур удлинения, можно облегчить доставку в желаемом отношении.

В одном варианте осуществления изобретения, две или более *cr*-РНК со структурированными удли-

нениями участвуют во взаимодействии путем "контактирования" РНК (так называемое взаимодействие "петля-петля"), которое происходит в том случае, если неспаренные нуклеотиды в одной структурированной последовательности удлинения (например, в шпилечной петле) образуют пары оснований с неспаренными нуклеотидами в другой структуре (например, в другой шпилечной петле) на второй *сг*-РНК. Пример взаимодействия такого типа проиллюстрирован на фиг. 11С. Образование контактирующих петель или других структур приводит к мультимеризации двух или более молекул *сг*-РНК. Эта стратегия может быть применена для связывания нескольких молекул *сг*-РНК.

Гибридизация комплементарных последовательностей при удлинении на каждой *сг*-РНК может быть также использована для облегчения мультимеризации. Так, например, супермолекулярные структуры *сг*-РНК могут быть сконструированы посредством удлиненных областей, которые обладают способностью к самосборке. Так, например, тример может быть образован тремя молекулами РНК с соответствующим образом расположенными областями гибридизации (см., например, фиг. 11D, панель (i); Shu D, Shu Y, Naque F, Abdelmawla S, & Guo P (2011) Thermodynamically stable RNA three-way junctions as platform for constructing multi-functional nanoparticles for delivery of therapeutics. *Nat Nanotechnol.* 6(10):658-667). Аналогичным образом, октамер РНК может быть получен путем сборки шестнадцати молекул РНК (см., фиг. 11D, панель (ii); Yu J, Liu Z, Jiang W, Wang G, & Mao C (2014) De novo design of an RNA tile that self-assembles into a homo-octameric nanoprism. *Nat Commun.* 6:5724).

Любое из удлинений вышеупомянутых типов может быть использовано в присутствии или в отсутствии последовательности процессинга. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота может включать множество последовательностей процессинга и последовательностей удлинения.

Так, например, нуклеиновая кислота может дополнительно содержать вторую последовательность процессинга у 5'-конца первой последовательности удлинения и вторую последовательность удлинения у 5'-конца второй последовательности процессинга. Вторые последовательности процессинга и удлинения могут быть такими же, как и первые последовательности процессинга и удлинения (например, повторы), либо любая из них, либо вторая последовательность процессинга и вторая последовательность удлинения могут отличаться от первой последовательности процессинга и/или от первой последовательности удлинения. Нуклеиновая кислота конкретно не ограничивается каким-либо количеством последовательностей процессинга и удлинения и может иметь 2, 3, 4, 5 и т.п. последовательностей процессинга и/или последовательностей удлинения.

5'-конец конструкции нуклеиновой кислоты (то есть последовательность процессинга или последовательность удлинения, если они присутствуют на 5'-конце) может быть дополнительно модифицирован, если это необходимо.

Так, например, 5'-конец может быть модифицирован функциональной группой, такой как функциональная группа, которая участвует в биоортогональных химических реакциях или химических реакциях типа "щелчка".

Так, например, 5'-конец нуклеиновой кислоты может быть химически модифицирован азидом, тетразином, алкином, стерическим алкеном или стерическим алкином. Такая модификация может облегчать присоединение желаемой химической группы или молекулы к конструкции посредством соответствующим образом спаренной функциональной группы.

5'-конец нуклеиновой кислоты может быть модифицирован так, чтобы он содержал биофункциональную молекулу, необязательно посредством биоортогональной химической реакции или химической реакции типа "щелчка", описанной выше.

Биофункциональная молекула может представлять собой любую молекулу, которая улучшает доставку или повышает активность РНК-зависимой эндонуклеазы или обеспечивает какую-либо другую желаемую функцию, такую как нацеливание нуклеиновой кислоты на конкретный участок-мишень (например, молекулу, которая нацелена на конкретный белок, клеточный рецептор, ткань и т.п.), или облегчает мониторинг конструкции (например, детектируемую метку, такую как флуоресцентный маркер, радиоактивная метка или т.п.).

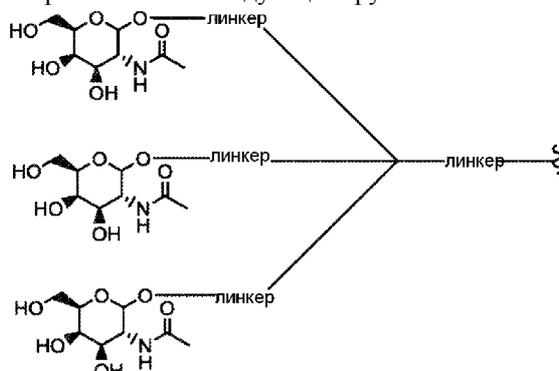
Примеры биофункциональных молекул включают, например, эндосомолитические полимеры, молекулы донорной ДНК, аминоксахара (например, N-ацетилгалатозамин (GalNAc) или три-GalNAc), направляющую РНК и/или РНК-метку (например, одноцепочечную направляющую РНК), а также другие пептиды, нуклеиновые кислоты и нацеливающие лиганды (например, антитела, лиганды, клеточные рецепторы, аптамеры, галактозу, сахара, небольшие молекулы).

В одном варианте осуществления изобретения, *сг*-РНК включает молекулу биотина или авидина (или стрептавидина), конъюгированную с удлиненной *сг*-РНК, что позволяет модифицированной *сг*-РНК связываться с другой молекулой (например, нацеливающей молекулой или пептидом), конъюгированной с авидином/стрептавидином или биотином, в зависимости от ситуации (см., например, фиг. 14).

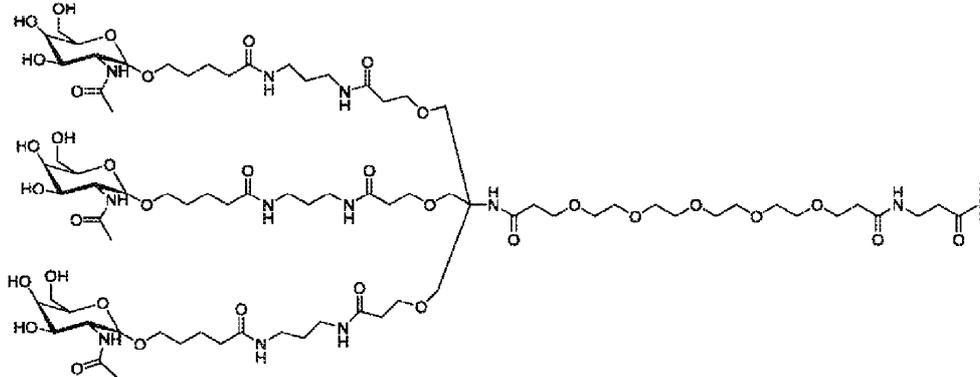
В другом варианте осуществления изобретения, удлинение *сг*-РНК может быть ковалентно связано с аминоксахаром любым подходящим способом, например, посредством линкера. Используемый здесь термин "аминосхар" означает молекулу сахара, в которой гидроксильная группа была заменена аминогруппой (например, галактозамином) и/или азотом, который является частью сложной функциональной

группы (например, N-ацетилгалактозамина (GalNAc); три-N-ацетилгалактозамина (трехкомпонентного N-ацетилгалактозамина)). Аминосахар может быть модифицирован так, чтобы он содержал необязательную спейсерную группу. Примеры аминосахаров включают N-ацетилгалактозамин (GalNAc), трехвалентный GalNAc или трехкомпонентный N-ацетилгалактозамин.

Пример группы аминосахаров включает следующие группы

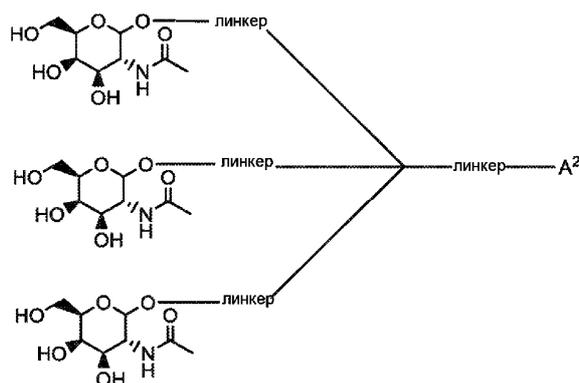


где линкер может представлять собой любой линкер, хорошо известный специалистам, и все эти линкеры могут быть одинаковыми или различными. Обычно, линкер представляет собой насыщенную или ненасыщенную алифатическую или гетероалифатическую цепь. Алифатическая или гетероалифатическая цепь обычно содержит 1-30 членов (например, 1-30 атомов углерода, азота и/или кислорода) и может быть замещена одной или более функциональными группами (например, одной или более группами, такими как кетон, эфир, сложный эфир, амид, спирт, амин, мочевины, тиомочевина, сульфоксид, сульфон, сульфонамид и/или дисульфид). В некоторых случаях используется более короткая алифатическая или гетероалифатическая цепь (например, имеющая приблизительно 1-15 членов, приблизительно 1-10 членов, приблизительно 1-5 членов, приблизительно 3-15 членов, приблизительно 3-10 членов, приблизительно 5-15 членов или приблизительно 5-10 членов в цепи). В других случаях используется более длинная алифатическая или гетероалифатическая цепь (например, цепь, имеющая приблизительно 5-30 членов, приблизительно 5-25 членов, приблизительно 5-20 членов, приблизительно 10-30 членов, приблизительно 10-25 членов, приблизительно 10-20 членов приблизительно 15-30 членов, приблизительно 15-25 членов или приблизительно 15-20 членов). Примеры спейсерных групп включают замещенный и незамещенный алкил, алкенил и полиэтиленгликоль (например, ПЭГ 1-10 или ПЭГ 1-5) или их комбинацию. Более конкретный пример, приведенный для иллюстрации, представляет собой



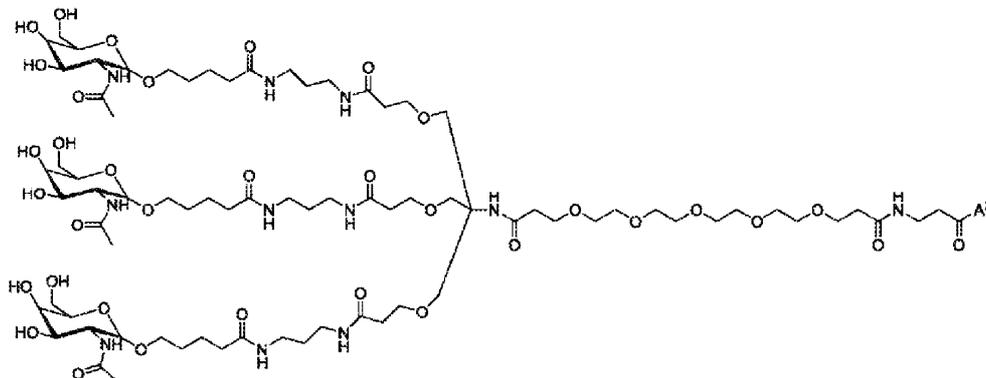
Аминосахар, до его конъюгирования с линкером, может содержать функциональную группу (например, азид, тетразин, алкин, стерический алкен или стерический алкин), что позволяет осуществлять конъюгирование с соответствующим образом спаренной функциональной группой, присоединенной к удлинению *сг*-РНК (например, у 5'-конца).

Так, например, аминосахар, до его конъюгирования с удлинённой *сг*-РНК, может содержать

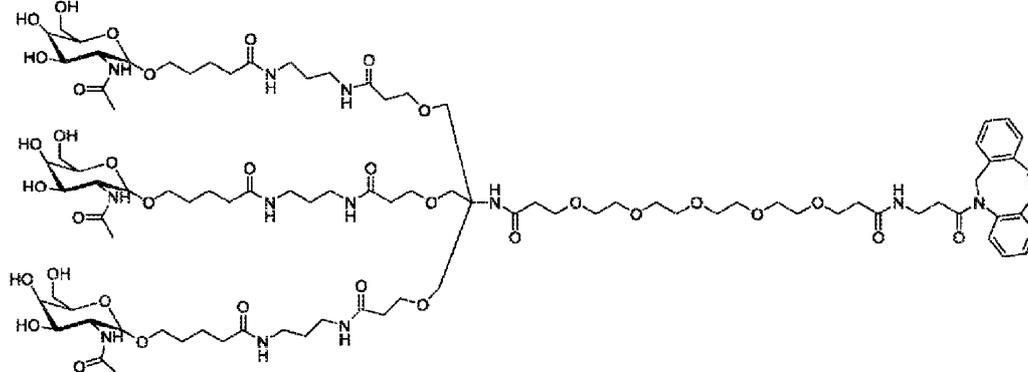


где А включает азид, тетразин, алкин, стерический алкен или стерический алкин, как описано в настоящей заявке.

Более конкретный пример представляет собой



где А включает азид, тетразин, алкин, стерический алкен или стерический алкин, как описано в настоящей заявке, например



Последовательность процессинга.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сг-РНК содержит последовательность процессинга. Последовательность процессинга представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая самоотщепляется *in vitro* или *in vivo* под действием Cpf1 без использования направляющей/нацеливающей последовательности. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, авторы лишь предполагают, что последовательность процессинга, если она присутствует, расщепляется после ее проникновения в клетку, и сг-РНК высвобождается из любой последовательности удлинения. Последовательность процессинга может быть расположена между сг-РНК и последовательностью удлинения. При такой конфигурации, после расщепления последовательности процессинга, сг-РНК высвобождается из последовательности удлинения описанной здесь конструкции нуклеиновой кислоты.

Последовательность процессинга также может быть расположена внутри последовательности удлинения, у 5'-конца последовательности удлинения или может служить в качестве последовательности удлинения. Также может быть использовано множество последовательностей процессинга. Так, например, вторая последовательность процессинга может служить в качестве последовательности удлинения, отдельно или вместе с дополнительными нуклеотидными последовательностями. Однако, последовательность удлинения обычно отличается от последовательности процессинга, если она присутствует. Кроме того, в одном варианте осуществления изобретения, последовательность удлинения не включает последовательность процессинга и/или любую другую целую (полноразмерную) последовательность сг-РНК.

В некоторых вариантах осуществления последовательность процессинга расположена непосредственно у 5'-конца сг-РНК (то есть непосредственно присоединена к последовательности сг-РНК). В других вариантах осуществления изобретения, спейсерная последовательность может присутствовать между сг-РНК и последовательностью процессинга. Спейсерная последовательность может иметь любую длину (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов), при условии, что она не будет препятствовать Срf1-расщеплению последовательности процессинга или осуществлению функции сг-РНК, высвобождаемой после расщепления.

В одном варианте осуществления изобретения, последовательность процессинга содержит фрагмент последовательности прямого повтора массива Срf1. Массивы Срf1 (также иногда называемые пре-сг-РНК) представляют собой природные массивы, содержащие последовательность прямого повтора и спейсерную последовательность между каждым прямым повтором. Часть прямого повтора массива содержит две части: часть последовательности сг-РНК и часть последовательности процессинга. В данном прямом повторе, часть последовательности процессинга расположена у 5'-конца части последовательности сг-РНК, а в большинстве случаев, непосредственно у 5'-конца части последовательности процессинга. В соответствии с этим вариантом осуществления изобретения, описанная здесь последовательность процессинга нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере фрагмент части последовательности процессинга прямого повтора, достаточной для расщепления Срf1. Так, например, последовательность процессинга может содержать фрагмент по меньшей мере из 5 смежных нуклеотидов части последовательности процессинга прямого повтора, например, по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов части последовательности процессинга прямого повтора (или всей части последовательности процессинга прямого повтора), длина которого будет зависеть от вида, от которого происходит прямой повтор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность процессинга включает всю часть процессинга последовательности прямого повтора. Прямой повтор может происходить от массива Срf1 любого микроорганизма. Примеры последовательностей прямого повтора и частей последовательностей процессинга прямого повтора представлены на фиг. 9. Последовательность процессинга нуклеиновой кислоты согласно изобретению может содержать фрагмент или полноразмерную последовательность любой из последовательностей процессинга на фиг. 9 (например, SEQ ID NO: 2-20).

Донорная нуклеиновая кислота.

Представленная здесь конструкция нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать донорную нуклеиновую кислоту (также называемую донорным полинуклеотидом). Донорный полинуклеотид представляет собой нуклеиновую кислоту, которая встраивается в сайт расщепления, индуцированный РНК-зависимой эндонуклеазой (например, Срf1). Нуклеиновая кислота донорного полинуклеотида может представлять собой нуклеиновую кислоту любого типа, известную специалистам. Так, например, нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, РНК, гибриды ДНК/РНК, искусственную нуклеиновую кислоту или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления изобретения, нуклеиновая кислота донорного полинуклеотида представляет собой ДНК, также известную здесь как "донорная ДНК".

Донорный полинуклеотид обычно является одноцепочечным и служит в качестве матрицы для создания двухцепочечной ДНК, содержащей желаемую последовательность. Донорный полинуклеотид будет достаточно идентичным (например, будет иметь последовательность, идентичную на 85, 90, 95 или 100%) геномной последовательности, фланкирующей сайт расщепления в области геномной последовательности рядом с сайтом расщепления (например, в пределах приблизительно 50 оснований или менее, в пределах приблизительно 30 оснований или менее, в пределах приблизительно 15 оснований или менее, или в пределах приблизительно 10 оснований или менее, в пределах приблизительно 5 оснований или менее, или непосредственно рядом с сайтом расщепления), что будет поддерживать опосредуемую гомологией репарацию между донорной последовательностью и геномными последовательностями, фланкирующими сайт расщепления, с последовательностью которого донорная последовательность имеет достаточную идентичность. Донорные полинуклеотидные последовательности могут иметь любую длину, но они должны иметь достаточное количество нуклеотидов, обеспечивающих идентичность последовательности по обеим сторонам сайта расщепления, для облегчения HDR. Эти области донорного полинуклеотида известны как гомологичные цепи. Гомологичные цепи могут иметь одинаковое или различное число оснований, и каждая из них обычно имеет длину по меньшей мере в 5 нуклеотидов (например, 10 нуклеотидов или более, 15 нуклеотидов или более, 20 нуклеотидов или более, 50 нуклеотидов или более, 100 нуклеотидов или более, 150 нуклеотидов или более или даже 200 нуклеотидов или более). Донорный полинуклеотид также содержит центральную область, содержащую мутацию, или другую представляющую интерес последовательность ДНК, которая фланкирована гомологичными цепями. Таким образом, общая длина донорного полинуклеотида обычно превышает общую длину обеих гомологичных цепей (например, приблизительно 15 нуклеотидов или более, приблизительно 20 нуклеотидов или более, 50 нуклеотидов или более, 100 нуклеотидов или более, 150 нуклеотидов или более, или даже 200 нуклеотидов или более, 250 нуклеотидов или более, 500 нуклеотидов или более, 1000 нуклеотидов или более, 5000 нуклеотидов или более).

Донорная полинуклеотидная последовательность обычно не идентична геномной последовательности

сти-мишени. Скорее всего, донорная полинуклеотидная последовательность может содержать одну или более модификаций, инсерций, делеций, инверсий или реаранжировок одного основания по отношению к геномной последовательности, при условии, что гомологичные цепи будут иметь последовательность, достаточно идентичную для поддержания HDR. Донорная полинуклеотидная последовательность может дополнительно содержать последовательности, которые облегчают обнаружение успешно встроенного донорного полинуклеотида.

Концы донорного полинуклеотида могут быть защищены (например, от экзонуклеолитической деградации) методами, известными специалистам в данной области. Так, например, один или более дезоксирибонуклеотидных остатков присоединяют к 3'-концу линейной молекулы, и/или аутокомплементарные олигонуклеотиды лигируют с одним или обоими концами. Дополнительные методы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают, но не ограничиваются ими, присоединение концевой(ых) аминогруппы (аминогрупп) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфотиоаты, фосфорамидаты и O-метилрибозные или дезоксирибозные остатки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, донорный полинуклеотид (например, донорная ДНК) ковалентно связан с 5'-концом sg-РНК Crpf1, 5'-концом последовательности процессинга или 5'-концом последовательности удлинения. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, донорный полинуклеотид связан с 5'-концом последовательности удлинения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связь между донорной ДНК и нуклеиновой кислотой является обратимой (например, дисульфидная связь).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, донорная ДНК ковалентно связана с конструкцией нуклеиновой кислоты. Так, например, донорный полинуклеотид может быть связан с последовательностью процессинга и может служить в качестве последовательности удлинения, расположенной у 5'-конца последовательности процессинга. В другом варианте осуществления изобретения, донорный полинуклеотид может быть связан с 5'-концом последовательности удлинения.

Нуклеиновая кислота и донорная ДНК могут быть связаны или конъюгированы любым известным методом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 3'-конец донорной ДНК и 5'-конец нуклеиновой кислоты модифицируют для облегчения связывания. Так, например, 5'-конец нуклеиновой кислоты может быть активирован тиопиридином, в то время как донорная ДНК может быть терминирована тиолом, что приводит к образованию дисульфидной связи между двумя молекулами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мостиковая ДНК, комплементарная нуклеиновой кислоте и донорной ДНК, гибридизуется и связывает две молекулы, что облегчает прохождение реакции.

На фиг. 5А-5С представлен неограничивающий пример синтеза донорной ДНК, конъюгированной с нуклеиновой кислотой.

В других вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота и донорная ДНК могут быть конъюгированы посредством функциональных групп, таких как функциональные группы, которые участвуют в биоортогональных химических реакциях или химических реакциях типа "щелчка". Так, например, 5'-конец нуклеиновой кислоты может быть химически модифицирован функциональной группой, такой как азид, тетразин, алкин, стерический алкен или стерический алкин, а 3'-конец донорной ДНК может быть химически модифицирован соответствующим образом спаренной функциональной группой. Так, например, если нуклеиновая кислота содержит азид, то такой азид будет реагировать с алкиновой группой донорной ДНК посредством реакции циклоприсоединения азид-алкин (катализируемой медью) или со стерической алкиновой группой донорной ДНК посредством реакции циклоприсоединения азид-стерический алкин (без использования катализатора). Аналогичным образом, если нуклеиновая кислота содержит тетразин, то тетразин будет реагировать со стерическим алкеном посредством реакции циклоприсоединения тетразин/алкен. Аналогичным образом, может быть использована обратная конфигурация, например, если нуклеиновая кислота содержит алкин, стерический алкин или стерический алкен, то он будет реагировать с азидной или тетразиновой группой донорной ДНК посредством той же самой реакции циклоприсоединения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота и донорная ДНК конъюгированы посредством линкера. Так, например, нуклеиновая кислота и донорная ДНК могут быть конъюгированы посредством самоудаляющегося линкера. Используемый здесь термин "самоудаляющийся линкер" представляет собой линкер, который гидролизует в определенных условиях (например, при определенных значениях pH), позволяющих высвободить донорную ДНК из нуклеиновой кислоты.

Линкер конъюгата "нуклеиновая кислота - донорная ДНК" охватывает любой линкер, известный специалистам в данной области, и способный ковалентно связывать донорную ДНК с нуклеиновой кислотой. Линкер может быть присоединен к донорной ДНК и к нуклеиновой кислоте у любого конца. Однако, в некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер присоединен к 5'-концу нуклеиновой кислоты (например, к 5'-концу sg-РНК, последовательности процессинга или последовательности удлинения) и к 3'-концу донорной ДНК. Линкер может быть присоединен к нуклеиновой кислоте и к донорной ДНК любым известным методом, таким как описанный здесь метод, относящийся к конъюгированию донорной ДНК с нуклеиновой кислотой.

В другом варианте осуществления изобретения, донорный полинуклеотид может быть гибридизо-

ван с последовательностью удлинения и/или с последовательностью процессинга. Так, например, последовательность удлинения может содержать последовательность, которая комплементарна донорному полинуклеотиду в степени, достаточной для облегчения гибридизации.

Если донорная нуклеиновая кислота ковалентно или нековалентно связана с последовательностью удлинения, то иногда желательно, чтобы донорная нуклеиновая кислота была связана с последовательностью удлинения или с ее частью, которые не расщепляются посредством cr-РНК Crp1 так, чтобы донорная нуклеиновая кислота была тесно связана с cr-РНК, если ген-мишень был отредактирован Crp1. Предполагается, что в некоторых случаях, улучшение редактирования генов может быть достигнуто с использованием такой конструкции. Последовательности удлинения, которые не расщепляются Crp1, включают, например, последовательности удлинения, содержащие одну или более модифицированных межнуклеотидных связей или синтетических нуклеотидов, описанных выше.

Композиции и носители.

Настоящее изобретение также включает композицию, содержащую любую из описанных здесь молекул нуклеиновой кислоты и носитель. Для доставки нуклеиновой кислоты может быть использован любой подходящий носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, носитель может содержать молекулу, способную взаимодействовать с любой из описанных здесь нуклеиновых кислот и облегчать проникновение нуклеиновой кислоты в клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, носитель содержит катионные липиды. Катионные липиды представляют собой амфифильные молекулы, которые имеют положительно заряженную полярную головную группу, связанную посредством якоря с неполярным гидрофобным доменом, обычно включающим две алкильные цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, катионные липиды образуют липосому (например, липидную везикулу) вокруг конструкции нуклеиновой кислоты и, необязательно, белка Crp1. Таким образом, в своем родственном аспекте, настоящее изобретение относится к липосоме, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты и, необязательно, белок Crp1.

В еще одном варианте осуществления изобретения, носитель содержит катионный полимер. Примеры катионных полимеров композиции согласно изобретению включают полиэтиленимин (PEI), полиаргинин, полилизин, полигистидин, поли-[2-((2-аминоэтил)амино)этиласпартамид] (pAsp(DET)), блок-сополимер полиэтиленгликоля (ПЭГ) и полиаргинина, блок-сополимер ПЭГ и полилизина, блок-сополимер ПЭГ и поли{N-[N-(2-аминоэтил)-2-аминоэтил]аспартамида} (ПЭГ-pAsp[DET]), ({2,2-бис[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил]-1,3-диоксан-5-ил} метил)диметиламин, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин, (3aR,5r,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин, (3aR,5R,7aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексагидробензо[d][1,3]диоксол-5-амин, (3aS,5R,7aR)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексагидробензо[d][1,3]диоксол-5-амин, (2-{2,2-бис[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил]-1,3-диоксан-4-ил} этил)диметиламин, (3aR,6aS)-5-метил-2-((6Z,9Z)-октадека-6,9-диен-1-ил)-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетрагидро-3aH-[1,3]диоксоло[4,5-с]пиррол, (3aS,7aR)-5-метил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексагидро-[1,3]диоксоло[4,5-с]пиридин, (3aR,8aS)-6-метил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексагидро-3aH-[1,3]диоксоло[4,5-d]азепин, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-2-(диметиламино)ацетат, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-3-(диметиламино)пропаноат, [6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат], (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-5-(диметиламино)пентаноат, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-6-(диметиламино)гексаноат, (3-{2,2-бис[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил]-1,3-диоксан-4-ил} пропил)диметиламин, 1-((3aR,5r,6aS)-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-ил)-N,N-диметилметанамин, 1-((3aR,5s,6aS)-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-ил)-N,N-диметилметанамин, 8-метил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-1,3-диокса-8-азаспиро[4,5]декан, (2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-4-ил)-N-метил-N-(пиридин-3-илметил)этанамин, 1,3-бис(9Z, 12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил-2-[2-(диметиламино)этил]пропандиоат, N,N-диметил-1-((3aR,5R,7aS)-2-((8Z,11Z)-октадека-8,11-диен-1-ил)-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексагидробензо[d][1,3]диоксол-5-ил)метанамин, N,N-диметил-1-((3aR,5S,7aS)-2-((8Z,11Z)-октадека-8,11-диен-1-ил)-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексагидробензо[d][1,3]диоксол-5-ил)метанамин, (1s,3R,4S)-N,N-диметил-3,4-бис((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси)циклопентанамин, (1s,3R,4S)-N,N-диметил-3,4-бис((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси)циклопентанамин, 2-(4,5-ди((8Z,11Z)-гептадека-8,11-диен-1-ил))-2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)-N,N-диметилэтанамин, 2,3-ди((8Z,11Z)-гептадека-8,11-диен-1-ил)-N,N-диметил-1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-амин, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диэтиламино)бутаноат, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-[бис(пропан-2-ил)амино]бутаноат, N-(4-N,N-диметиламино)бутаноил-(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-амин, (2-{2,2-бис[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил]-1,3-диоксан-5-ил} этил)диметиламин, (4-{2,2-бис[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил]-1,3-диоксан-5-ил} бутил)диметиламин, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил(2-(диметиламино)этил)карбамат, 2-

(диметиламино)этил(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-илкарбамат, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-3-(этиламино)пропаноат, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(пропан-2-иламино)бутаноат, N1,N1,N2-триметил-N2-((11Z,14Z)-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)икоса-11,14-диен-1-ил)этан-1,2-диамин, 3-(диметиламино)-N-((11Z,14Z)-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)икоса-11,14-диен-1-ил)пропанамид, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(метиламино)бутаноат, диметил({4-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]метил}бутил)амин, 2,3-ди((8Z,11Z)-гептадека-8,11-диен-1-ил)-8-метил-1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан, 3-(диметиламино)пропил(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-илкарбамат, 2-(диметиламино)этил((11Z,14Z)-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)икоса-11,14-диен-1-ил)карбамат, 1-((3aR,4R,6aR)-6-метокси-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетрагидрофуоро[3,4-d][1,3]диоксол-4-ил)-N,N-диметилметанамин, (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-аминобутаноат, 3-(диметиламино)пропил((11Z,14Z)-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)икоса-11,14-диен-1-ил)карбамат, 1-((3aR,4R,6aS)-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)тетрагидрофуоро[3,4-d][1,3]диоксол-4-ил)-N,N-иметилметанамин, (3aR,5R,7aR)-N, N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексагидробензо[d][1,3]диоксол-5-амин, (11Z,14Z)-N,N-диметил-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)икоса-11,14-диен-1-амин, (3aS,4S,5R,7R,7aR)-N,N-диметил-2-((7Z,10Z)-октадека-7,10-диен-1-ил)-2-((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексагидро-4,7-метанобензо[d][1,3]диоксол-5-амин, N,N-диметил-3,4-бис((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси)бутан-1-амин и 3-(4,5-ди((8Z,11Z)-гептадека-8,11-диен-1-ил)-1,3-диоксолан-2-ил)-N,N-диметилпропан-1-амин. Может быть также использован любая комбинация вышеуказанных полимеров.

В других вариантах осуществления изобретения, носитель содержит полимерную наночастицу. Так, например, композиция согласно изобретению может быть введена в виде наночастиц, как описано в Международной патентной заявке № PCT/US2016/052690, которая точно включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Полипептид Cpf1 или кодирующая его нуклеиновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, включающих вышеуказанные липосомные варианты, композиция также содержит полипептид Cpf1 или кодирующую его нуклеиновую кислоту. В композиции согласно изобретению может быть использован любой полипептид Cpf1, хотя Cpf1 должен быть соответствующим образом выбран так, чтобы он функционировал в комбинации с cr-PHK конструкции нуклеиновой кислоты в композиции для расщепления нуклеиновой кислоты-мишени и/или расщепления последовательности процессинга конструкции нуклеиновой кислоты, если она имеется. Cpf1 композиции может представлять собой природный Cpf1 или вариант или мутант полипептида Cpf1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 является ферментативно активным, например, полипептид Cpf1, если он связан с направляющей РНК, расщепляет нуклеиновую кислоту-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 обладает пониженной ферментативной активностью по сравнению с полипептидом Cpf1 дикого типа (например, по сравнению с полипептидом Cpf1, содержащим аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 8 (SEQ ID NO: 1)), и сохраняет ДНК-связывающую активность. Мутации, которые изменяют ферментативную активность Cpf1, известны специалистам.

Так, например, Cpf1 может происходить от бактерии рода *Acidaminococcus* или рода *Lachnospiraceae*, или от любого рода или вида, определенного на фиг. 9. Пример последовательности белка Cpf1 представлен на фиг. 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90% или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90% или 100% идентична смежному фрагменту длиной от 100 аминокислот до 200 аминокислот (а.к.), от 200 а.к. до 400 а.к., от 400 а.к. до 600 а.к., от 600 а.к. до 800 а.к., от 800 а.к. до 1000 а.к., от 1000 а.к. до 1100 а.к., от 1100 а.к. до 1200 а.к. или от 1200 а.к. до 1300 а.к. аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на

90% или 100% идентична аминокислотной последовательности домена RuvCI полипептида Cpf1, аминокислотная последовательность которого представлена на фиг. 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90% или 100% идентична аминокислотной последовательности домена RuvCII полипептида Cpf1, аминокислотная последовательность которого представлена на фиг. 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90% или 100% идентична аминокислотной последовательности домена RuvCIII полипептида Cpf1, аминокислотная последовательность которого представлена на фиг. 8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 представляет собой FnCpf1, Lb3Cpf1, BpCpf1, PcCpf1, SsCpf1, AsCpf1, Lb2Cpf1, CMtCpf1, EeCpf1, MbCpf1, LiCpf1, Lb2Cpf1, PcCpf1, PdCpf1 или PmCpf1 или полипептид Cpf1, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90% или 100% идентична аминокислотной последовательности этого полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид Cpf1 содержит аминокислотную замену (например, замену D→A) в аминокислотном остатке, соответствующем положению 917 аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 8; и/или аминокислотную замену (например, замену E→A) в аминокислотном остатке, соответствующем положению 1006 аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 8; и/или аминокислотную замену (например, замену D→A) в аминокислотном остатке, соответствующем положению 1255 аминокислотной последовательности, представленной на фиг. 8.

Полипептид Cpf1 может также представлять собой Cpf1, инактивированный РНКазой, такой как Cpf1, содержащий модификацию в H800A, K809A, K860A, F864A или R790A Cpf1 *Acidaminococcus* (AsCpf1) или в соответствующем положении другого ортолога Cpf1. Примеры мутантных белков Cpf1 включают белки, раскрытые в Zetsche et al., "Multiplex Gene Editing by CRISPR-Cpf1 Through Autonomous Processing of a Single crRNA Array", *Nat. Biotechnol.* 2017, 35 (1), 31-34. Полипептид Cpf1 может также представлять собой редактор оснований dCpf1 (например, гибридный белок Cpf1-цитозин-деаминаза). Примерами являются, например, белки, раскрытые Li et al., *Nature Biotechnology*, 36 324-327 (2018) и Mahfouz et al., *Biochem J.*, 475(11), 1955-1964 (2018). Примером синтетического варианта Cpf1 является ортолог MAD7 Cpf1 от Inscripta, Inc. (CO, USA). Дополнительными примерами белков Cpf1 являются любые из этих белков Cpf1, включая химерные или мутантные белки, раскрытые в Международной патентной заявке № PCT/US2016/052690, которая точно включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Другие нуклеиновые кислоты.

Композиция может дополнительно содержать другие нуклеиновые кислоты помимо ст-РНК. Так, например, композиция может содержать описанный здесь донорный полинуклеотид. Альтернативно или дополнительно, композиция может содержать одну или более дополнительных нуклеиновых кислот, которые не являются донорными полинуклеотидами (например, нуклеиновую кислоту, последовательность которой не является в значительной степени идентичной редактируемой последовательности-мишени (например, на уровне идентичности последовательности, которая является недостаточной для гомологичной рекомбинации), или идентичной любой эндогенной последовательности клеточной нуклеиновой кислоты, которая должна быть отредактирована). Этими дополнительными нуклеиновыми кислотами могут быть РНК или ДНК, такие как одноцепочечная молекула РНК или ДНК (или гибридная молекула, содержащая РНК и ДНК, необязательно, с остатками синтетической нуклеиновой кислоты). Дополнительная нуклеиновая кислота может иметь любую длину, например, длину по меньшей мере в 5 нуклеотидов (например, 10 нуклеотидов или более, 15 нуклеотидов или более, 20 нуклеотидов или более, 50 нуклеотидов или более, 100 нуклеотиды или более, 150 нуклеотидов или более или даже 200 нуклеотидов или более). В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновая кислота может содержать 500 нуклеотидов или более, 1000 нуклеотидов или более или даже 5000 нуклеотидов или более. Однако в большинстве случаев, нуклеиновая кислота будет содержать приблизительно 5000 нуклеотидов или менее, например, приблизительно 1000 нуклеотидов или менее или даже 500 нуклеотидов или менее (например, 200 нуклеотидов или менее).

Композиция может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует конкретный представляющий интерес белок, например, РНК-зависимую эндонуклеазу (например, полипептид Crp1). РНК-зависимая эндонуклеаза может представлять собой любую описанную здесь эндонуклеазу согласно другим аспектам изобретения.

Ионы двухвалентных металлов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция, по существу или полностью, не содержит иона двухвалентного металла (например, магния), который активирует конкретный белок Crp1, используемый для снижения или предотвращения преждевременного расщепления последовательности процессинга перед доставкой. Композиция считается, по существу, не содержащей магния, если его концентрация является недостаточной для достижения ферментативной активности аутопроцессинга Crp1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция содержит приблизительно 20 мМ или менее NaCl и, по существу или полностью, не содержит магния или других двухвалентных ионов, которые активируют белок Crp1.

Способ генетической модификации эукариотической клетки.

Настоящее изобретение также относится к способу генетической модификации эукариотической клетки-мишени, включающему контактирование эукариотической клетки-мишени с любыми описанными здесь нуклеиновыми кислотами или композициями (например, с нуклеиновой кислотой, содержащей cr-РНК Crp1, последовательность удлинения у 5'-конца cr-РНК и, необязательно, последовательность процессинга между cr-РНК и последовательностью удлинения) для генетической модификации нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, cr-РНК нуклеиновой кислоты Crp1 содержит нацеливающую последовательность (например, у 3'-конца доменов "стебель-петля"), которая гибридизуется с последовательностью-мишенью в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, cr-РНК Crp1 содержит последовательность процессинга, которая расщепляется после проникновения в клетку, высвобождая тем самым cr-РНК Crp1 из последовательности процессинга и последовательности удлинения. В других вариантах осуществления изобретения, cr-РНК Crp1 не содержит последовательности процессинга.

Нуклеиновая кислота-мишень представляет собой полинуклеотид (например, РНК, ДНК), с которым нацеливающая последовательность cr-РНК будет связываться и индуцировать расщепление под действием Crp1. Нуклеиновая кислота-мишень содержит "сайт-мишень" или "последовательность-мишень", которые представляют собой последовательность, присутствующую в нуклеиновой кислоте-мишени, с которой гибридизуется cr-РНК, которая, в свою очередь, направляет эндонуклеазу в нуклеиновую кислоту-мишень.

"Эукариотическая клетка-мишень" может представлять собой любую эукариотическую клетку, известную специалистам, и включает клетки *in vivo* и *in vitro*. В одном варианте осуществления изобретения, клетка-мишень представляет собой клетку млекопитающего.

Для доставки композиции млекопитающему может быть применен любой способ введения. Действительно, хотя для введения композиции может быть применен более, чем один способ, однако, данный способ может обеспечивать более быструю и более эффективную реакцию, чем другой способ. При введении в клетки *in vitro* или *ex vivo*, нуклеиновая кислота или композиция могут быть подвергнуты контактированию с клеткой любым подходящим способом. Так, например, нуклеиновая кислота может быть заключена в липосому, покрытую катионным полимером и/или введена посредством электропорации. При введении индивидууму, такому как млекопитающее или человек, композиция может быть введена любыми различными способами. Так, например, доза композиции может быть также введена или инъецирована в полость тела, нанесена на кожу (например, с помощью трансдермального пластыря), введена путем ингаляции, проглатывания, местного нанесения на ткань или введена парентерально, например, внутривенно, внутривнутрино, перорально, интрадермально, подкожно или внутриартериально.

Композиция может быть введена в устройство или нанесена на устройство, которое обеспечивает регулируемое или замедленное высвобождение, такое как губка, биосовместимая сетка, механический резервуар или механический имплантат. Имплантаты (см., например, патент США 5443505), устройства (см., например, патент США 4863457), такие как имплантируемое устройство, например, механический резервуар или имплантат, или устройство, состоящее из полимерной композиции, являются особенно подходящими для введения композиции. Композиция может быть также введена в форме препаратов с пролонгированным высвобождением (см., например, патент США 5378475), включающих, например, гелевую пену, гиалуроновую кислоту, желатин, сульфат хондроитина, полифосфозфир, такой как бис-2-гидроксиэтил-терефталат (ВНЕТ) и/или сополимер молочной и гликолевой кислоты.

Примеры

Нижеследующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, однако, само собой разумеется, что они никоим образом не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения. В нижеприведенной табл. 2 приводятся последовательности нуклеиновых кислот, используемых в этих экспериментах.

Таблица 2
Дополнительная таблица 1

оцрПНК для Cas9	rGrCrCrGrUrCrCrArGrCrUrCrGrArCrCrArGrGrArGrUr rUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGr UrUrArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrA rUrCrArArCrUrUrGrArArArArGrUrGrGrCrArCrCr GrArGrUrCrGrGrUrGrCrUrUrUrU
сг-ПНК ⁺⁴	rUrGrGrArUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrAr GrArUrCrGrUrCrGrCrCrGrUrCrCrArGrCrUrCrGrArCr CrA
сг-ПНК ⁺⁹	rGrGrGrArArUrGrGrArUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCr UrUrGrUrArGrArUrCrGrUrCrGrCrCrGrUrCrCrArGrCr UrCrGrArCrCrA
Неспецифическая сг-ПНК ⁺⁹	rGrGrUrGrArGrCrArArUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCr UrUrGrUrArGrArUrCrGrUrCrGrCrCrGrUrCrCrArGrCr UrCrGrArCrCrA
сг-ПНК ⁺⁹ dU	rGrGrUrGrArGrCrAUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrU rUrGrUrArGrArUrCrGrUrCrGrCrCrGrUrCrCrArGrCrU rCrGrArCrCrA
сг-ПНК ⁺⁹ S	rA*rU*rG*rG*rU*rG*rA*rG*C*rUrArArUrUrUrCrUr ArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrGrUrCrGrCrCrGrUrCr CrArGrCrUrCrGrArCrCrA
сг-ПНК ⁺¹⁵	rGrU rCrArA rArGrG rGrArA rUrGrG rArUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rCrGrU rCrGrC rCrGrU rCrCrA rGrCrU rCrGrA rCrCrA
сг-ПНК ⁺²⁵	rArUrG rUrGrU rUrUrU rUrGrU rCrArA rArArG rArCrC rUrUrU rUrUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rCrGrU rCrGrC rCrGrU rCrCrA rGrCrU rCrGrA rCrCrA
сг-ПНК ⁺⁵⁹	rGrGrCrCrArGrCrUrUrGrCrCrGrGrUrUrUrUrUrAr GrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrU

	rUrGrUrCrArArArGrArCrCrUrUrUrUrArArUrUr UrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrGrUrCrGrCrCr GrUrCrCrArGrCrUrCrGrArCrCrA
cr-PHK ⁺⁵⁹ _D2	rUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrUrGrUrCrArArArAr GrArCrCrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrU rUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrUrArArUrUr UrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrGrUrCrGrCrCr GrUrCrCrArGrCrUrCrGrArCrCrA
cr-PHK ⁺⁵⁹ _D3	rGrGrCrGrGrCrUrUrGrCrCrGrGrUrUrUrUrUrArGr UrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrU rGrUrCrUrArArGrArArCrUrUrUrArArArUrArArUrUr UrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrGrUrCrGrCrCr GrUrCrCrArGrCrUrCrGrArCrCrA
Ai9 cr-PHK	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUr CrCrArArArCrUrCrArUrCrArArUrGrUrArUrCrU
Ai9 cr-PHK ⁺²	rUrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrAr UrUrCrCrArArArCrUrCrArUrCrArArUrGrUrArUrCrU
Ai9 cr-PHK ⁺⁹	rArGrArCrCrUrUrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCr UrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArArArCrUrCrArUrCrArA rUrGrUrArUrCrU
Ai9 cr-PHK ⁺⁵⁹	rGrArGrCrArGrCrUrUrGrCrCrGrGrUrUrUrUrUrAr GrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrU rUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrUrArArUrUr UrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUrCrCrArArArC rUrCrArUrCrArArUrGrUrArUrCrU
cr-PHK Serpina 1	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrUr CrGrUrCrGrArUrGrGrUrCrArGrCrArCrArGrCrC
cr-PHK ⁺⁹ Serpina 1	rCrUrCrCrCrCrUrCrCrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrU rUrGrUrArGrArUrUrCrGrUrCrGrArUrGrGrUrCrArGr CrArCrArGrCrC
оцODN с сайтом рестриктирующего фермента ClaI	CTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGCTTAC GTCGCCGTCCAGCTCGACCATCGATGGGCACCA CCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCA T

оцДНК без какой-либо гомологии		GGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATG GCGCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCATCGATG GTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTGGAGGGGA G
оцДНК для эксперимента с миобластами ai9	c	CTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGC CTCTAAAAACATGGCgCCAGCAGCTTCAGTCCC TTTCTCATCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCAC G
оцПНК для эксперимента с миобластами ai9	c	rArGrArArArGrGrGrArCrUrGrArArGrCrUrGrCrUrGr UrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rGrArA rArUrA rGrCrA rArGrU rUrArA rArArU rArArG rGrCrU rArGrU rCrCrG rUrUrA rUrCrA rArCrU rUrGrA rArArA rArGrU rGrGrC rArCrC rGrArG rUrCrG rGrUrG rCrUrUrUrU
9 н.к.-оцПНК для эксперимента с GFP-НЕК	c	rGrGrGrArArUrGrGrA
100 н.к.- оцПНК для эксперимента с GFP-НЕК		rArArGrUrArArArArCrCrUrCrUrArCrArArUrGrGr UrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArUrArGrCrArArG rUrUrArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUr ArUrCrArArCrUrUrGrArArArArGrUrGrGrCrArCrC rGrArGrUrCrGrGrUrGrCrUrUrUrU

*: фосфортиоат.

U: 2'-дезоксид.

Подчеркнуто: последовательности пре-сг-ПНК.

Пример 1.

В этом примере показано, что немодифицированная сг-ПНК Cpf1 имеет тенденцию к снижению эффективности редактирования генов по сравнению с оцПНК Cas9.

SpCas9 и AsCpf1, оба без удлинения направляющей ПНК, сравнивали с использованием репортерной системы на основе белка, флуоресцирующего в зеленом диапазоне спектра (GFP). Для прямого сравнения AsCpf1 и SpCas9 была выбрана соответствующая протоспейсерная последовательность ДНК в гене GFP, которая может распознаваться обеими нуклеазами. Эти системы проиллюстрированы на фиг. 13А. Комплексы RNP вводили в клетки HEK293Т, экспрессирующие ген GFP под контролем индуцибельного промотора доксициклина (GFP-НЕК), посредством электропорации и с использованием катионных липидов. Активность редактирования определяли путем оценки популяции GFP-негативных клеток, причем, GFP разрушали путем введения инсерций-делений, опосредуемых NHEJ.

RNP AsCpf1 продемонстрировал меньшую степень редактирования генов, чем SpCas9, в клетках, обработанных путем электропорации, и в клетках, обработанных липофектаминоном (фиг. 13В и 13С). Клетки, обработанные AsCpf1 RNP путем электропорации, были GFP-негативными на 31%, а клетки, обработанные RNP SpCas9, были GFP-негативными на 41% (фиг. 13В). В системах доставки с использованием липофектамина и RNAiMax, AsCpf1-обработанные клетки были GFP-негативными приблизительно на 8%, а SpCas9-обработанные клетки были GFP-негативными приблизительно на 30% (фиг. 13С).

Пример 2.

В этом примере продемонстрировано, что нуклеиновая кислота, содержащая сг-ПНК Cpf1, последовательность процессинга у 5'-конца сг-ПНК Cpf1 и последовательность удлинения у 5'-конца последовательности процессинга (обратно суперзаряженной сг-ПНК), улучшает доставку Cpf1 катионными липидами *in vitro*.

Катионные соединения, такие как липофектамин и поликатионы, являются наиболее часто используемыми носителями для доставки нуклеиновых кислот в клетки и в организм животных. Поэтому была проанализирована эффективность катионного липидного липофектамина для трансфекции комплексов Cpf1/сг-ПНК в клетки НЕК, экспрессирующие белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра (GFP-НЕК). Вкратце, был получен комплекс сг-ПНК, сконструированной для нокдауна гена GFP посред-

ством инсерции-делеции, с Cpf1, и этот комплекс вводили в клетки путем электропорации (нуклеофекции) или трансфецировали липофектамином. Затем определяли эффективность редактирования генов путем определения числа GFP-нокаутированных клеток с помощью проточной цитометрии, где клетки, которые больше не экспрессировали GFP, указывают на то, что эти клетки были трансфецированы комплексом Cpf1/cr-РНК.

Результаты этого эксперимента показали, что липофектамин не может эффективно трансфецировать немодифицированные комплексы cr-РНК Cpf1 (фиг. 1А). В частности, клетки, обработанные липофектамином и комплексами Cpf1/cr-РНК, имели только 8% эффективность NHEJ, тогда как клетки, подвергнутые электропорации с использованием комплексов Cpf1/cr-РНК, имели 40% эффективность NHEJ, что указывает на то, что ограничения доставки были основной причиной низкой эффективности NHEJ при использовании липофектамина.

Для оценки эффекта удлинения последовательности, cr-РНК, длина которой составляет 41 нуклеотид, удлиняли на 9 нуклеотидов (cr-РНК⁺⁹) или на 59 нуклеотидов (cr-РНК⁺⁵⁹). Удлинение включало последовательность аутопроцессинга, которая может саморасщепляться с образованием активной cr-РНК. Затем получали комплекс каждой из немодифицированной cr-РНК, cr-РНК⁺⁹ и cr-РНК⁺⁵⁹ с Cpf1 и трансфецировали в клетки GFP-НЕК с использованием липофектамина. RNP были получены в условиях низкого содержания соли для предотвращения потенциального процессинга 5'-концевого удлинения. Уровень NHEJ, который является показателем эффективности трансфекции, определяли путем вычисления процента GFP-негативных клеток.

Как показано на фиг. 1В, удлинение cr-РНК с помощью последовательности аутопроцессинга значительно повышает эффективность трансфекции катионными носителями. Клетки, обработанные неудлиненной cr-РНК с использованием липофектамина, были GFP-негативными на 8%, тогда как клетки, обработанные cr-РНК, удлиненной на 9 оснований, были GFP-негативными на 18%, а клетки, обработанные cr-РНК, удлиненной на 59 оснований, были GFP-негативными на 37%, что приблизительно в 4 раза больше, чем в случае контрольной немодифицированной cr-РНК. Кроме того, cr-РНК+9, cr-РНК+15 и cr-РНК+25 были протестированы с использованием липофектамина, и было обнаружено, что повышение эффективности редактирования генов зависит от их длины (фиг. 1С).

Для того, чтобы выяснить, существует ли потребность в специфической последовательности 5'-удлинения для повышения такой эффективности, было проведено сравнение трех различных 5'-удлинений на 59 нуклеотидов. Первая и исходная cr-РНК с удлинением на 59 нуклеотидная описана выше и содержит одну пре-cr-РНК AsCpf1 (cr-РНК+59); вторая cr-РНК с удлинением на 59 нуклеотидов содержит четыре сайта пре-cr-РНК AsCpf1 в тандеме (cr-РНК+59-D2); а третья cr-РНК с удлинением на 59 нуклеотидов содержит пре-cr-РНК FnCpf1, перед которой присутствует неспецифическая последовательность ДНК, без гомологии с какой-либо последовательностью в геноме человека (cr-РНК+59-D3) (фиг. 1D). Эти cr-РНК были доставлены с использованием липофектамина 2000 по аналогии с описанием, приведенным в предыдущем параграфе. Все три 5'-удлинения показали эквивалентную активность редактирования: клетки cr-РНК+59 были GFP-негативными на 32%, клетки cr-РНК+59_D2 были GFP-негативными на 30%, а клетки cr-РНК+59_D3 были GFP-негативными на 27% (фиг. 1E). Это позволяет предположить, что не существует каких-либо строгих требований к последовательностям 5'-удлинения в отношении повышения такой активности, что соответствует предыдущим результатам для cr-РНК с удлиненными на 9 нуклеотидов, введенных в клетки путем электропорации. Кроме того, эти результаты лишь подтверждают высказанную выше гипотезу относительно увеличения плотности отрицательного заряда на cr-РНК, и, следовательно, можно также предположить, что комплекс AsCpf1 RNP будет улучшать доставку AsCpf1 в клетки под действием катионных липидов.

Удлиненные cr-РНК тестировали в анализе на расщепление ДНК *in vitro* для того, чтобы определить, будут ли удлиненные cr-РНК повышать природную нуклеазную активность Cpf1. Между тремя протестированными cr-РНК: cr-РНК дикого типа, cr-РНК⁺⁹ и cr-РНК⁺⁵⁹, каких-либо различий в активности за время инкубирования 15 мин и 60 мин не наблюдалось. cr-РНК⁺ обнаруживала даже еще более медленное расщепление ДНК, чем cr-РНК дикого типа, за время инкубирования всего 5 мин.

Было также проведено использование 5'-удлиненных cr-РНК для того, чтобы определить, повышалась ли активность редактирования генов в Cpf1, если доставка осуществлялась с использованием плазмиды, а не RNP. Плазмиду Cpf1 трансфецировали за 24 ч до электропорации cr-РНК и определяли активность редактирования генов. Какого-либо повышения эффективности редактирования генов не наблюдалось, в случае, когда Cpf1 была получена из плазмид.

Кроме того, cr-РНК метили флуоресцентным красителем, для того, чтобы определить, улучшается ли поглощение удлиненных cr-РНК клетками после доставки посредством электропорации или с использованием липофектамина. Электропорация RNP Cpf1 приводила к тому, что более 90% клеток были позитивными по красителю-cr-РНК и обеспечивала высокоэффективную доставку независимо от длины cr-РНК. Эффективность доставки Cpf1 RNP с использованием липофектамина зависела от длины cr-РНК, и удлиненные cr-РНК доставлялись в клетки НЕК 293Т более эффективно, чем cr-РНК дикого типа (фиг. 1F).

Результаты показали, что описанная здесь удлиненная cr-РНК повышает эффективность доставки и

редактирования генов.

Пример 3.

В этом примере продемонстрировано, что активность Cpf1 усиливается в случае 5'-концевых удлинений в клетках НЕК посредством электропорации.

Нацеленные на GFP сг-РНК с 5'-концевыми удлинениями на 4, 9, 15, 25 и 59 нуклеотидов были введены в клетки GFP-НЕК путем электропорации в виде комплекса RNP с AsCpf1. Последовательности для удлинений на 4-25 нуклеотидов были сделаны неспецифическими, а последовательность с удлинением на 59 нуклеотидов состояла из пре-сг-РНК AsCpf1, перед которой находилась неспецифическая последовательность РНК без какой-либо гомологии с последовательностью генома человека.

Все сг-РНК с 5'-удлинениями на 4-25 нуклеотидов продемонстрировали резкое увеличение эффективности редактирования генов по сравнению с сг-РНК без удлинения. Клетки, подвергнутые электропорации с использованием неудлиненной сг-РНК, были GFP-негативными на 30% (сг-РНК), с использованием сг-РНК, удлиненной на 4-25 нуклеотидов, были GFP-негативными на 55-60%, а с использованием сг-РНК, удлиненной на 59 нуклеотидов, были GFP-негативными на 37% (фиг. 2). Уровни редактирования генов для 5'-удлиненной сг-РНК на 4 и 25 нуклеотидов, были сравнимы с уровнями для клеток, подвергнутых электропорации с использованием RNP SpCas9.

Эти результаты подтвердили, что 5'-удлинения сг-РНК Cpf1 повышают эффективность редактирования генов.

Пример 4.

В этом примере продемонстрировано, что нуклеиновая кислота, содержащая сг-РНК Cpf1 и последовательность удлинения у 5'-конца, улучшает доставку Cpf1 под действием катионных липидов *in vivo*, а также активность Cpf1 в клетках.

Были проведены исследования на сг-РНК с удлинением путем введения трех различных химических модификаций: 2'-О-метильной модификации, фосфориоатных связей и дезоксинуклеотидрибозных групп (фиг. 15A). Первые 3 из 4 нуклеотидов были удлинены 2'-О-метилнуклеотидами и 3'-фосфориоатной связью (MS), дезоксинуклеотидом в 9-м положении сг-РНК, 5'-удлиненной на 9 нуклеотидов (9dU), 3'-фосфориоатной связью для всех 9 нуклеотидов плюс дезоксинуклеотид в 9-м положении сг-РНК, 5'-удлиненной на 9 нуклеотидов (9s).

RNP Cpf1 с сг-РНК, которые имели удлинение и химические модификации, подвергали электропорации в клетки GFP-НЕК, и активность редактирования генов определяли с помощью проточной цитометрии. Удлиненная сг-РНК с химическими модификациями имела активность, сходную с активностью немодифицированной удлиненной сг-РНК (41-46% GFP-негативных клеток) (фиг. 15D).

Кроме того, эти сг-РНК были оценены с использованием клеточной линии НЕК293Т, экспрессирующей белок, флуоресцирующий в синем диапазоне спектра (BFP), (BFP-НЕК). Результаты представлены на фиг. 12.

Результаты этого эксперимента показали, что 5'-удлинения повышают эффективность редактирования генов AsCpf1, и сообщают резистентность 5'-конца сг-РНК к химическим модификациям. Кроме того, 5'-химические модификации сг-РНК могут быть использованы без нарушения активности в случае удлинения 5'-конца сг-РНК.

Ключевым преимуществом использования химически модифицированных сг-РНК является то, что они являются более устойчивыми к гидролизу сывороточными нуклеазами. Поэтому была исследована стабильность 5'-химически модифицированной сг-РНК в сыворотке.

5'-химически модифицированные сг-РНК инкубировали в разведенной фетальной бычьей сыворотке, и их деградацию анализировали с помощью гель-электрофореза. На фиг. 15B проиллюстрирована количественная оценка сг-РНК, оставшейся после 15-минутного инкубирования в сыворотке. Результаты показали, что немодифицированные сг-РНК быстро разлагаются в сыворотке, тогда как сг-РНК^{+9S}, которая содержит фосфориоатный остов, значительно более устойчива к гидролизу в сыворотке.

Было также проведено исследование 5'-модифицированных сг-РНК для того, чтобы определить, могут ли они повышать способность липофектамина трансфецировать Cpf1 RNP благодаря его способности защищать сг-РНК от нуклеаз в клетках и в сыворотке. Cpf1 с сг-РНК^{+9S} была более эффективной для редактирования генов в клетках, чем сг-РНК⁺, на 40%, что позволяет предположить, что химические модификации 5'-сг-РНК, обеспечиваемые удлинением 5'-сг-РНК, будут находить широкое применение в редактировании генов (фиг. 15C).

Недавно была идентифицирована кристаллическая структура RNP Cpf1 и было продемонстрировано, что белок AsCpf1 участвует во множестве взаимодействий с фосфодиэфирным остовом сг-РНК. Следовательно, 5'-химические модификации неудлиненной сг-РНК имеют высокую вероятность нарушения важных взаимодействий между сг-РНК и Cpf1, что будет приводить к нарушению активности редактирования гена AsCpf1.

В противоположность этому, сг-РНК с 5'-удлинениями, по-видимому, будут устойчивыми к химическим модификациям, поскольку нуклеотиды, взаимодействующие с белком AsCpf1, не были модифицированы. Эти результаты позволяют разработать методику введения химических модификаций у 5'-конца сг-РНК, которые могут потенциально улучшать доставку при терапевтических применениях ex

vivo и *in vivo*. Такая конструкция также позволяет другим молекулам, таким как нацеливающий лиганд, молекула, уходящая из эндосомы, или другие функциональные молекулы, конъюгироваться с удлиненной *сг*-РНК и захватываться молекулой Cpf1. Так, например, биотин или авидин (или стрептавидин) могут быть конъюгированы с удлинением *сг*-РНК, что позволяет модифицированной *сг*-РНК связываться с другой молекулой (например, с нацеливающей молекулой), конъюгированной со стрептавидином или биотином, в зависимости от ситуации (см., например, фиг. 14). Кроме того, *сг*-РНК может быть конъюгирована с мРНК Cpf1 посредством удлинения, что позволяет доставлять Cpf1 путем трансляции мРНК. После трансляции мРНК Cpf1 и продуцирования белка Cpf1 в цитоплазме, белок Cpf1 будет распознавать часть *сг*-РНК конструкции и, необязательно, процессировать последовательность связывающей РНК, разделяя, тем самым, мРНК и *сг*-РНК Cpf1.

Пример 5.

Были также проведены эксперименты для того, чтобы определить, может ли *сг*-РНК с удлиненной последовательностью повышать способность катионных полимеров трансфицировать Cpf1. В частности, *сг*-РНК различной длины, используемые в примере 2 (*сг*-РНК без удлинения, с удлинением на 9 нуклеотидов и на 59 нуклеотидов), подвергали реакции образования комплекса с Cpf1, смешивали с катионным полимером PAsp(DET) и добавляли к клеткам GFP-НЕК. Эффективность NHEJ композиций определяли путем измерения частоты встречаемости GFP-негативных клеток с помощью проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 16, 5'-удлинение на 59 нуклеотидов приводило к 2-кратному улучшению PAsp(DET)-опосредуемой доставки RNP AsCpf1 в клетки. Неудлиненная *сг*-РНК (*сг*-РНК), была GFP-негативной на 8%, *сг*-РНК, удлиненная на 9 нуклеотидов (*сг*-РНК+9), была GFP-негативной на 10%, а *сг*-РНК, удлиненная на 59 нуклеотидов (*сг*-РНК+59), была GFP-негативной на 18%. Эти результаты продемонстрировали, что последовательности удлинения могут улучшать доставку *сг*-РНК в клетки с использованием катионных полимеров.

Пример 6.

В этом примере продемонстрировано, что удлиненная *сг*-РНК улучшает доставку Cpf1 *in vivo*.

Было проведено эксперименты для того, чтобы определить, может ли удлиненная *сг*-РНК (*сг*-РНК⁺⁵⁹) улучшать опосредованную катионными липидами доставку Cpf1 *in vivo*. Схема эксперимента представлена на фиг. 3А.

Эти исследования были проведены на мышцах Ai9 с использованием ранее подтвержденных спейсеров. Мышам Ai9 вводили одну внутримышечную инъекцию липофектамина или PAsp(DET) в комбинации с комплексом AsCpf1-*сг*-РНК или с комплексом AsCpf1-*сг*-РНК⁺⁵⁹. Через две недели после инъекции, экспрессию tdTomato (флуоресценцию в красном диапазоне спектра) визуализировали в 10 мкм-срезах икроножной мышцы (мышцы, показанной на фиг. 3В). Сравнение изображений, сделанных для неудлиненной и удлиненной *сг*-РНК, показало, что удлиненная *сг*-РНК значительно повышала способность PAsp(DET) доставлять AsCpf1 RNP *in vivo*. Кроме того, RNP с удлиненной *сг*-РНК (Cpf1 RNP+59) в комплексе с PAsp(DET) индуцировал экспрессию tdTomato на расстоянии в несколько миллиметров от участка инъекции, а также во всей икроножной мышце. Широкий диапазон экспрессии tdTomato в мышцах, вероятно, обусловлен уникальной многоядерной природой мышечных волокон. Это позволило экспрессировать TdTomato по всей длине мышечного волокна и, следовательно, наблюдать такую экспрессию длиной в несколько миллиметров.

Способность *сг*-РНК, удлиненной на 59 нуклеотидов, улучшать доставку и, в результате такого удлинения, эффективность редактирования AsCpf1 RNP *in vivo*, будет повышать ценность Cpf1 как средства для исследований на животных и как потенциального терапевтического средства для лечения заболеваний человека, особенно генетических мышечных дистрофий.

Пример 7.

5.1. Удлиненная *сг*-РНК повышает уровень HDR и NHEJ.

Для того, чтобы проверить, может ли 5'-удлинение повышать уровни HDR в дополнение к уровням NHEJ, RNP AsCpf1 вместе с *сг*-РНК, содержащей различные удлинения, вводили в клетки GFP-НЕК вместе с одноцепочечным олигонуклеотидным донором (оцODN). Уровни NHEJ определяли путем оценки популяции GFP-негативных клеток (как описано в первом разделе), а уровни HDR количественно определяли с помощью анализа на расщепление рестриктирующим ферментом. 2-кратное улучшение HDR наблюдалось для *сг*-РНК, удлиненных на 4 и 9 нуклеотидов (частота HDR 17% для *сг*-РНК+4 и частота HDR 18% для *сг*-РНК+9 против 9% для немодифицированной *сг*-РНК как показано на фиг. 4А). Меньшее увеличение HDR наблюдалось для удлинения на 59 оснований (уровень HDR 13% для *сг*-РНК+59 на фиг. 4А).

Интересно отметить, что оцODN, используемый для HDR, также резко повышал эффективность NHEJ AsCpf1. оцODN повышал процент GFP-негативных клеток с 30 до 46% для неудлиненной *сг*-РНК (*сг*-РНК), с 55 до 95% для *сг*-РНК, удлиненной на 4 основания (*сг*-РНК+4), с 58 до 93% для *сг*-РНК, удлиненной на 9 оснований (*сг*-РНК+9), и с 37 до 58% для *сг*-РНК, удлиненной на 59 оснований (*сг*-РНК+59) (фиг. 4В). Обнаружение того факта, что экзогенно добавленная ДНК повышает эффективность редактирования, опосредуемого RNP AsCpf1, было дополнительно подтверждено в репортерной системе BFP. Одноцепочечная ДНК (оцДНК) без какой-либо гомологии с геномом человека была введена в клетки

BFP-НЕК путем электропорации с использованием RNP AsCpf1. Аналогичным образом, присоединение оцДНК повышало активность редактирования AsCpf1 в 2 раза как для неудлиненных, так и для удлиненных сг-РНК. BFP-негативная популяция увеличилась с 31 до 50% для неудлиненной сг-РНК (сг-РНК), с 59 до 91% для сг-РНК, удлиненной на 4 нуклеотида (сг-РНК+4), и с 60 до 95% для сг-РНК, удлиненной на 9 нуклеотидов (сг-РНК+9) (фиг. 4С). Были проведены дополнительные эксперименты для того, чтобы определить, может ли экзогенно добавленная ДНК иметь гомологию с сайтом-мишенью RNP Cpf1, и тем самым повышать эффективность редактирования генов. RNP AsCpf1 вводили в клетки путем электропорации вместе с одноцепочечной ДНК (оцДНК) без какой-либо гомологии с последовательностью-мишенью, и оценивали эффективность редактирования генов. Аналогичным образом, добавление оцДНК без гомологии также приводило к повышению активности редактирования AsCpf1 приблизительно на 90% для обоих удлиненных сг-РНК (фиг. 4D). Эти результаты показали, что оцДНК может улучшать редактирование с помощью AsCpf1. Кроме того, повышение активности в случае 5'-концевого удлинения было синергичным с экзогенной оцДНК, и, в целом, индуцированное ими редактирование генов приближалось к 100%. Было отмечено, что добавление оцДНК не повышало эффективности редактирования гена Cpf1, если вместо электропорации применяли метод доставки с использованием липофектамина.

Иногда, для редактирования генов предпочтительно использовать РНК, а не ДНК, поскольку оцРНК не может интегрироваться в геном и может быть более безопасной для использования. Для проверки влияния оцРНК, а не ДНК, клетки GFP-НЕК подвергали электропорации с использованием Cpf1 RNP и двух различных оцРНК (с удлинением на 9 нуклеотидов и 100 нуклеотидов) и определяли результирующие уровни редактирования генов. Две оцРНК длиной в 100 нуклеотидов с небольшим изменением последовательности резко повышали эффективность редактирования генов Cpf1, а именно, в 2 раза, тогда как оцРНК с удлинением в 9 нуклеотидов давала 10% повышение эффективности редактирования генов (фиг. 4E).

Эти результаты продемонстрировали, что одноцепочечные нуклеиновые кислоты могут быть использованы для повышения активности редактирования Cpf1 в клетках.

5.2. Одна молекула, включающая удлиненную сг-РНК и донорную ДНК.

В части 2 этого примера продемонстрировано, что удлиненная сг-РНК, объединенная с донорной ДНК в одной молекуле, может улучшать HDR.

Подавляющее большинство генетических заболеваний требуют генной коррекции вместо нокаута, и поэтому большой интерес представляет разработка терапевтических средств на основе Cpf1, которые могут корректировать генные мутации посредством HDR. Для решения проблемы получения наночастиц, которые эффективно инкапсулируют как донорную ДНК, так и Cpf1-сг-РНК, были проведены эксперименты для того, чтобы определить, можно ли объединить сг-РНК и донорную ДНК в одну молекулу посредством обратимой дисульфидной связи. Одна из проблем заключается в том, что 5'-конец сг-РНК является достаточно чувствительным к химическим модификациям, как сообщалось ранее. Следовательно, были протестированы химические модификации на 5'-конце сг-РНК с удлиненной последовательностью аутопроцессинга.

сг-РНК была удлинена на четыре дополнительных нуклеотида на ее 5'-конце, и к концу нуклеотидов была добавлена химическая модификация (то есть 5'DBCO, 5'-тиол или 5'-азид). Активность сг-РНК, удлиненных на 4 нуклеотида, была протестирована в присутствии и в отсутствие химических модификаций у 5'-конца. Вкратце, 5'-модифицированная суперзаряженная сг-РНК, сконструированная для нокаута гена GFP посредством введения инсерций-делеций, была подвергнута реакции образования комплекса с Cpf1 и введена в клетки путем электропорации (нуклеофекции). Затем определяли эффективность редактирования генов путем измерения числа GFP-нокаутированных клеток с помощью проточной цитометрии, где клетки, уже не экспрессирующие GFP, указывают на то, что они были трансфицированы комплексом Cpf1/сг-РНК.

На фиг. 4F показано, что ни одна из химических модификаций или удлинений нуклеотидов не влияла на активность Cpf1-сг-РНК, поскольку все комплексы сг-РНК обнаруживали GFP-нокаут приблизительно 40%, что аналогично уровням для немодифицированной контрольной сг-РНК.

Поскольку химическая модификация на 5'-конце сг-РНК может быть введена без потери активности, то 5'-конец сг-РНК активировали тиопиридином для реакции взаимодействия с донорной ДНК с концевыми тиоловыми группами (см. фиг. 5A-5C). Реакция между двумя макромолекулами имеет медленную кинетику. Поэтому, был применен метод с использованием мостиковой ДНК которая комплементарна как сг-РНК, так и донорной ДНК. Этот мостик гибридизуется с двумя макромолекулами и связывает их вместе, что облегчает реакцию и повышает выход продукта конъюгирования между сг-РНК и донорной ДНК. Выход продукта конъюгирования составлял до 40%, и этот продукт очищали с помощью гель-экстракции. Этот конъюгат был назван "Гомологичная ДНК-сг-РНК" (HD-РНК). HD-РНК содержит дисульфидную связь, которая должна быть восстановлена в цитоплазме. Опосредованное тиолом расщепление HD-РНК определяли, путем ее инкубирования в DTT в течение 6 ч и анализа ее молекулярной массы с помощью гель-электрофореза. Сравнение гелей на фиг. 5C показало, что DTT восстанавливает HD-РНК и регенерирует донорную ДНК и сг-РНК.

HD-РНК, образующую комплекс с Cpf1, вводили в клетки GFP-НЕК путем электропорации, и

уровни HDR и NHEJ сравнивали с уровнями для клеток, подвергнутых электропорации с использованием Crpf1-cr-PHK и донорной ДНК по отдельности. Аналогичные уровни NHEJ и HDR наблюдались в клетках, подвергнутых электропорации с использованием HD-PHK, по сравнению с клетками, подвергнутыми электропорации с использованием Crpf1-cr-PHK и донорной ДНК, что указывает на то, что конъюгирование cr-PHK с донорной ДНК посредством дисульфидной связи не влияет на функциональность ни cr-PHK, ни донорной ДНК.

Были проведены эксперименты для того, чтобы определить, может ли HD-PHK повышать эффективность HDR Crpf1 после трансфекции катионными липидами (то есть липофектами) или катионными полимерами (то есть PAsp(DET)). В этих экспериментах, HD-PHK, образующую комплекс с Crpf1, трансфицировали в клетки GFP-HEK с использованием липофектамина или PAsp(DET) и сравнивали уровни HDR и NHEJ. NHEJ определяли путем измерения частоты встречаемости GFP-негативных клеток и подтверждали путем проведения анализа Surveyor с использованием ПЦР-ампликона в области мишени гена BFP. Эффективность HDR определяли путем выделения клеточной ДНК и ее анализа на присутствие сайта рестриктирующего фермента, встроенного в донорную ДНК. Результаты представлены на фиг. 6 и 7.

На фиг. 6 и 7 продемонстрировано, что HD-PHK повышает эффективность NHEJ и HDR Crpf1 после доставки с использованием PAsp(DET). В частности, HDR была детектирована в 60% клеток, обработанных комплексом HD-RNA/Crpf1, доставленным с использованием PAsp(DET), и этот показатель значительно превышает показатель HDR для клеток, обработанных Crpf1/cr-PHK и донорной ДНК в комплексе с PAsp(DET). Кроме того, 60% HDR, наблюдаемые при использовании комплекса HD-PHK/Crpf1, доставленного вместе с PAsp(DET), были даже выше, чем частота HDR, наблюдаемая при электропорации комплексов Crpf1/cr-PHK, что позволяет предположить, что наличие донорной ДНК рядом с сайтом расщепления Crpf1 может повышать уровень HDR.

Эти результаты продемонстрировали, что удлиненная cr-PHK может повышать уровень HDR.

Пример 9.

В этом примере продемонстрировано применение удлиненной cr-PHK в клетках другого типа и применение этого метода для лечения генетических расстройств.

HD-PHK может быть применена по многим целям благодаря тому, что она может повышать способность Crpf1 генерировать HDR в клетках после ее доставки с использованием катионных липидов. Применение HD-PHK в медицине было впервые протестировано на мышечной дистрофии Дюшенна (МДД). МДД представляет собой заболевание с летальным исходом на ранней стадии, вызываемое мутациями в гене дистрофина; это заболевание наиболее часто характеризуется как врожденная миопатия, и приблизительно 30% пациентов с МДД имеют мутации в одно основание или небольшие делеции, которые потенциально можно лечить с использованием препаратов на основе HDR.

Следовательно, HD-PHK, сконструированную для нацеливания на ген дистрофина, тестировали на ее способность корректировать мутацию дистрофина в миобластах, полученных у мышей mdx посредством HDR. Была получена HD-PHK, которая могла расщеплять ген дистрофина, и которая также содержала донорную ДНК, сконструированную для коррекции замены С на Т, присутствующей в гене дистрофина (см. фиг. 10А и 10В). Затем определяли уровень HDR в миобластах mdx, обработанных Crpf1/HD-PHK+липофектаминам, и результаты сравнивали с результатами для миобластов mdx, обработанных Crpf1-cr-PHK, донорной ДНК и липофектаминам. Было обнаружено, что Crpf1 в комплексе с HD-PHK, является более эффективным при генерировании HDR в миобластах mdx, чем клетки, обработанные RNP Crpf1 и донорной ДНК. Так, например, клетки, обработанные HD-PHK, имели уровень HDR 5-10%, тогда как контрольные клетки имели уровень HDR только 1%.

В другом эксперименте, первичные миобласты, выделенные у мыши Ai9, которая представляет собой трансгенную мышь, содержащую стоп-кодоны во всех 3 рамках считывания, сцепленных с тройным поли(А)-сигналом, расположенным выше репортера tdTomato, подвергали электропорации с использованием RNP AsCrpf1, образующего комплекс с cr-PHK с 5'-удлинениями и без них. Мышь Ai9 представляет собой трансгенную мышь, содержащую репортерный ген tdTomato, который имеет стоп-кодоны во всех 3 рамках считывания, сцепленных с тройным поли(А)-сигналом. Спейсеры AsCrpf1 были сконструированы для введения множества разрывов в ДНК, что приводит к удалению стоп-последовательности посредством геномной делеции. На успешное редактирование генов указывает экспрессия tdTomato (белок, флуоресцирующий в красном диапазоне спектра, RFP), который может быть визуализирован с помощью флуоресцентной микроскопии и количественно оценен с помощью проточной цитометрии. Удлиненные cr-PHK повышали эффективность редактирования генов на 40-50% по сравнению с неудлиненной cr-PHK. Миобласты, обработанные неудлиненной cr-PHK, были RFP-позитивными на 12%; миобласты, обработанные cr-PHK, удлиненной на 2 нуклеотида, были RFP-позитивными на 15%; миобласты, обработанные cr-PHK, удлиненной на 9 нуклеотидов, были RFP-позитивными на 18%, а миобласты, обработанные cr-PHK, удлиненной на 59 нуклеотидов, были RFP-позитивными на 16% (фиг. 10С). Кроме того, эффективность редактирования генов была протестирована с использованием cr-PHK вместе с оцДНК и оцРНК (100 нуклеотидов) без какой-либо гомологии последовательностей для нацеливания на ДНК первичных миобластов. оцДНК и оцРНК повышали эффективность редактирования генов (фиг. 10D).

В целом, делеция последовательности-мишени в первичных миобластах позволяет предположить, что повышение эффективности редактирования генов посредством удлиненных cr-РНК может найти широкое применение в отношении генетических мишеней и типов клеток. Эти результаты демонстрировали, что HD-РНК может быть использована в качестве терапевтического средства для лечения генетических заболеваний.

Пример 10.

В нижеследующем примере продемонстрировано, что повышение эффективности редактирования генов посредством 5'-удлинений cr-РНК может найти широкое применение в отношении генетических мишеней и типов клеток. Эти cr-РНК были протестированы для того, чтобы выяснить, могут ли они повышать способность RNP Crpf1 редактировать эндогенный ген с использованием Serpinal в качестве испытательного стенда.

Crpf1 вместе с cr-РНК или cr-РНК⁺, нацеленные на ген Serpinal, трансфицировали в клетки HepG2 посредством электропорации. Serpinal был выбран для дальнейшего исследования, поскольку мутация в гене Serpinal вызывает дефицит альфа1-анти-трипсина, что делает его мишенью для редактирования терапевтических генов. Для количественной оценки эффективности NHEJ была проведена "цифровая капельная" ПЦР на геномной ДНК клеток HepG2.

RNP Crpf1 с cr-РНК⁺ обладает повышенной эффективностью NHEJ по сравнению с cr-РНК дикого типа, как показано на фиг. 10E. Эти результаты также показали, что эффективность редактирования генов посредством 5'-удлинений cr-РНК может найти широкое применение в отношении генетических мишеней.

Все документы, включая публикации, патентные заявки и патенты, цитированные в настоящей заявке, вводятся в настоящее описание посредством ссылки, как если бы каждый документ был отдельно и конкретно включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Используемые формы единственного числа, словосочетание "по меньшей мере один" и аналогичные референты, употребляемые в контексте описания настоящего изобретения (а в частности, в контексте нижеследующей формулы изобретения), могут относиться как к объектам в единственном числе, так и к объектам во множественном числе, если это не оговорено особо или явно не противоречит контексту описания заявки. Использование термина "по меньшей мере один", за которым следует список из одного или более элементов (например, "по меньшей мере один из А и В"), следует понимать как один элемент, выбранный из перечисленных элементов (А или В) или любую комбинацию двух или более из перечисленных элементов (А и В), если это не оговорено особо или явно не противоречит контексту описания. Термины "содержащий", "имеющий", "охватывающий" и "включающий" следует толковать как инклюзивные термины (то есть означающие "включая, но не ограничиваясь ими"), если это не оговорено особо. Перечисление интервалов значений в настоящей заявке приводится просто как сокращенный способ индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение в данном интервале, если это не оговорено особо, и каждое отдельное значение вводится в настоящее описание так, как если бы оно было отдельно указано в настоящей заявке. Все описанные здесь способы могут быть осуществлены в любом подходящем порядке, если это не оговорено особо или явно не противоречит контексту описания. Использование любых и всех представленных здесь примеров или иллюстративных словосочетаний (например, "таких как"), приводится просто для лучшего понимания настоящего изобретения и не должно рассматриваться как ограничение объема изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна быть истолкована как указание на какой-либо незаявленный элемент, имеющий важное значение для практического применения настоящего изобретения.

В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления изобретения, включая наилучший способ осуществления изобретения, известный авторам.

Изменения этих предпочтительных вариантов осуществления изобретения могут быть очевидными для специалистов в данной области после прочтения описания, приведенного выше. Авторы изобретения считают, что квалифицированные специалисты будут использовать такие варианты, если это необходимо, и авторы изобретения предполагают, что это изобретение может быть реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в настоящей заявке. В соответствии с этим, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, перечисленные в прилагаемой формуле изобретения в соответствии с патентным законодательством. Кроме того, в настоящее изобретение входит любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариантах, если это не оговорено особо или явно не противоречит контексту изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, содержащая сг-РНК Cpfl, где указанная сг-РНК Cpfl содержит домен "стебель-петля", расположенный с 5'-стороны от нацеливающей последовательности, и последовательность удлинения из по меньшей мере 4 нуклеотидов и не более 100 нуклеотидов, расположенная с 5'-стороны от сг-РНК, где последовательность удлинения не содержит аптамера или последовательности сг-РНК.
2. Нуклеиновая кислота по п.1, дополнительно содержащая последовательность процессинга между сг-РНК и последовательностью удлинения, где последовательность процессинга представляет собой последовательность, которая саморасщепляется под действием Cpfl.
3. Нуклеиновая кислота по п.2, где последовательность процессинга содержит фрагмент последовательности прямого повтора массива Cpfl, где последовательность прямого повтора содержит часть последовательности сг-РНК и часть последовательности процессинга, расположенную у 5'-конца части последовательности сг-РНК, и этот фрагмент содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов части последовательности процессинга прямого повтора.
4. Нуклеиновая кислота по п.3, где последовательность процессинга содержит фрагмент по меньшей мере из 10 нуклеотидов части последовательности процессинга прямого повтора.
5. Нуклеиновая кислота по п.3, где последовательность процессинга включает всю часть последовательности процессинга прямого повтора.
6. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-5, где последовательность удлинения включает по меньшей мере 6 нуклеотидов.
7. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-6, где последовательность удлинения содержит 10-100 нуклеотидов.
8. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-6, где последовательность удлинения содержит менее чем приблизительно 60 нуклеотидов.
9. Нуклеиновая кислота по п.8, где последовательность удлинения содержит менее чем приблизительно 20 нуклеотидов.
10. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-9, где нуклеиновая кислота содержит только одну последовательность сг-РНК Cpfl.
11. Нуклеиновая кислота по любому из пп.2-10, дополнительно содержащая вторую последовательность у 5'-конца последовательности удлинения и вторую последовательность удлинения у 5'-конца второй последовательности процессинга.
12. Нуклеиновая кислота по любому из пп.2-10, дополнительно содержащая донорную нуклеиновую кислоту, гибридизованную или ковалентно связанную с ней.
13. Нуклеиновая кислота по п.12, где донорная нуклеиновая кислота ковалентно связана с 5'-концом последовательности процессинга или с 5'-концом последовательности удлинения.
14. Нуклеиновая кислота по п.12 или 13, где донорная нуклеиновая кислота связана с последовательностью процессинга или с последовательностью удлинения посредством линкерной группы.
15. Нуклеиновая кислота по п.12, где донорная нуклеиновая кислота гибридизуется с последовательностью удлинения и/или с последовательностью процессинга.
16. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1 или 4-8, где нуклеиновая кислота не содержит последовательность процессинга.
17. Нуклеиновая кислота по п.16, где нуклеиновая кислота дополнительно содержит донорную нуклеиновую кислоту, ковалентно связанную с 5'-концом последовательностью удлинения.
18. Нуклеиновая кислота по п.17, где донорная нуклеиновая кислота связана посредством линкерной группы.
19. Нуклеиновая кислота по п.16, где нуклеиновая кислота дополнительно содержит донорную нуклеиновую кислоту, гибридизованную с последовательностью удлинения.
20. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-19, где последовательность удлинения содержит самогибридирующуюся последовательность.
21. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-20, где последовательность удлинения содержит полустабильную шпильчатую структуру, стабильную шпильчатую структуру, структуру псевдоузла, G-квадруплексную структуру, структуру выпуклой петли, структуру внутренней петли, структуру разветвленной петли или их комбинации.
22. Нуклеиновая кислота по п.21, где последовательность удлинения содержит повторяющийся тринуклеотидный мотив.
23. Нуклеиновая кислота по п.22, где повторяющийся тринуклеотидный мотив представляет собой САА, UUG, ААG, СUУ, ССU, ССА, UAA или их комбинацию.
24. Нуклеиновая кислота по п.22, где повторяющийся тринуклеотидный мотив представляет собой САU, СUА, UUA, АUГ, UAG или их комбинацию.
25. Нуклеиновая кислота по п.22, где повторяющийся тринуклеотидный мотив представляет собой СGА, СGU, СGГ, СAG, СUG, ССG или их комбинацию.

26. Нуклеиновая кислота по п.22, где повторяющийся тринуклеотидный мотив представляет собой мотив CNG или комбинацию мотивов CNG, необязательно с CGA или CGU.

27. Нуклеиновая кислота по п.22, где повторяющийся тринуклеотидный мотив представляет собой AGG, UGG или их комбинацию.

28. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-22, где последовательность удлинения содержит комбинацию повторяющихся тринуклеотидных мотивов по любому из пп.23-27.

29. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-28, где последовательность удлинения или ее часть являются резистентными к расщеплению нуклеазой.

30. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-29, где последовательность удлинения содержит одну или более модифицированных межнуклеотидных связей.

31. Нуклеиновая кислота по п.30, где область из 4 или более смежных нуклеотидов последовательности удлинения или всей последовательности удлинения имеет модифицированные межнуклеотидные связи.

32. Нуклеиновая кислота по п.30 или 31, где модифицированные межнуклеотидные связи включают фосфориоатные, фосфодитиоатные, метилфосфонатные, фосфорамидатные связи, 2'-О-метильные связи, 2'-О-метоксиэтильные связи, 2'-фтор-содержащие связи, мостиковую нуклеиновую кислоту (BNA) или модифицированные фосфотриэфирные связи или их комбинации.

33. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-32, где последовательность удлинения включает одну или более ксенонуклеиновых кислот (XNA).

34. Конъюгат, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-33 и молекулу биотина и/или авидина или стрептавидина, присоединенную к 5'-концу последовательности удлинения.

35. Конъюгат по п.34, где нуклеиновая кислота дополнительно содержит молекулу биотина, присоединенную к 5'-концу последовательности удлинения; молекулу авидина или стрептавидина, конъюгированную с молекулой биотина; и, необязательно, нацеливающую конструкцию, содержащую молекулу биотина, конъюгированную с авидином или стрептавидином.

36. Конъюгат по п.35, где нацеливающая конструкция представляет собой пептид, содержащий присоединенную к нему молекулу биотина.

37. Композиция для генетической модификации эукариотической клетки-мишени, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-33 или конъюгат по любому из пп.34-36 и носитель.

38. Композиция по п.37, дополнительно содержащая белок Crp1.

39. Композиция по п.38, где композиция по существу не содержит иона двухвалентного металла, который катализирует расщепление Crp1.

40. Композиция по п.38 или 39, где композиция содержит катионные липиды.

41. Композиция по любому из пп.38-40, где нуклеиновая кислота находится в липосоме.

42. Композиция по любому из пп.38-40, где нуклеиновая кислота частично или полностью инкапсулирована полимерной наночастицей или присоединена к металлической или полимерной наночастице.

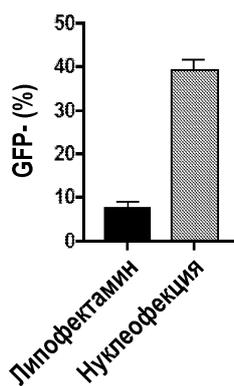
43. Способ генетической модификации эукариотической клетки-мишени, включающий контактирование эукариотической клетки-мишени с белком Crp1 и нуклеиновой кислотой по любому из пп.1-33 или конъюгатом по любому из пп.34-36 или с композицией по любому из пп.37-41 для генетической модификации нуклеиновой кислоты-мишени.

44. Способ по п.43, где cr-RНК Crp1 содержит нацеливающую последовательность, которая гибридизуется с последовательностью-мишенью в клетке-мишени.

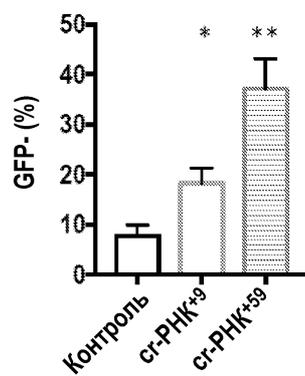
45. Способ по п.43 или 44, где клетка-мишень представляет собой клетку млекопитающего, необязательно клетку человека.

46. Способ по любому из пп.43-45, где конструкция нуклеиновой кислоты расщепляется после ее проникновения в клетку, высвобождая тем самым cr-RНК Crp1 из других частей конструкции нуклеиновой кислоты.

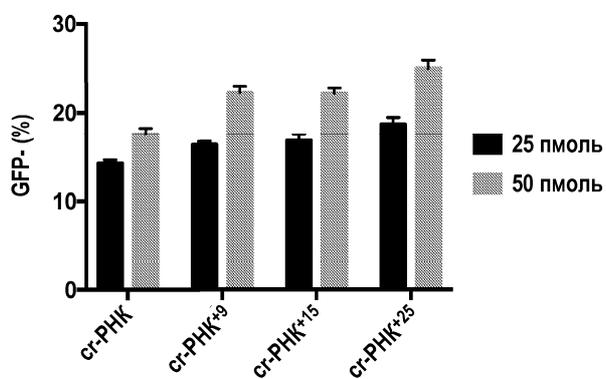
Обычная cr-РНК



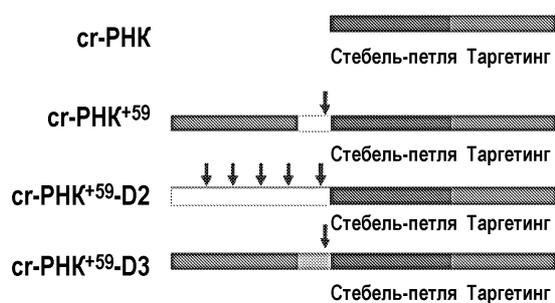
Фиг. 1А



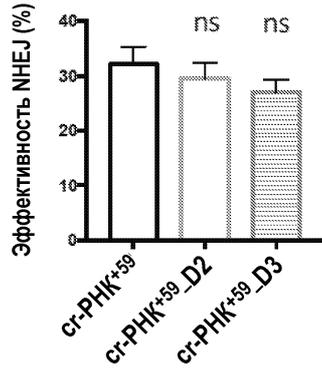
Фиг. 1В



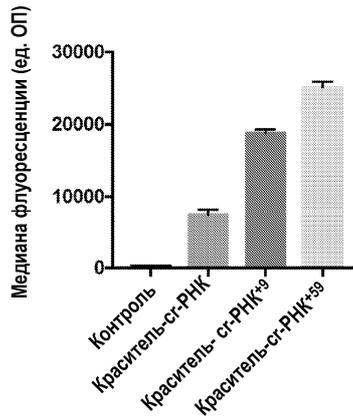
Фиг. 1С



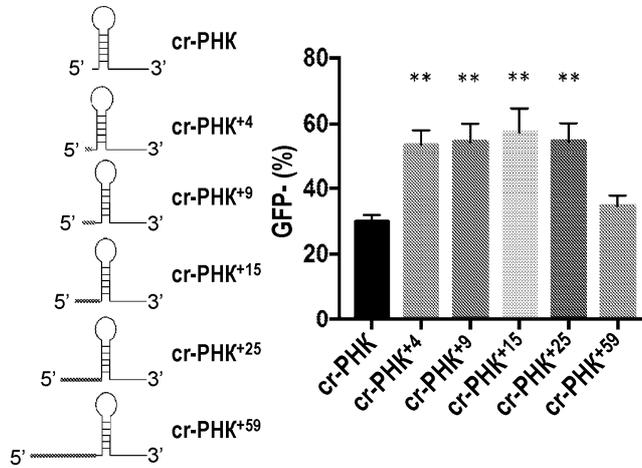
Фиг. 1D



Фиг. 1E

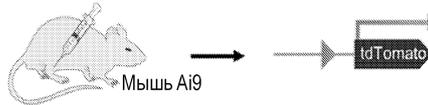


Фиг. 1F

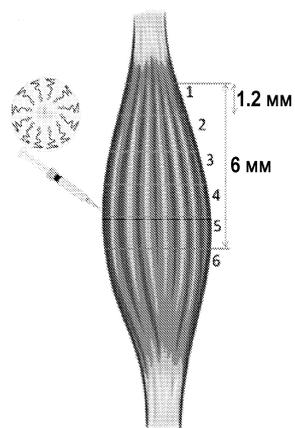


Фиг. 2

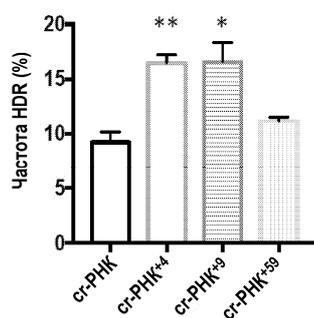
Инъекция в мышцу



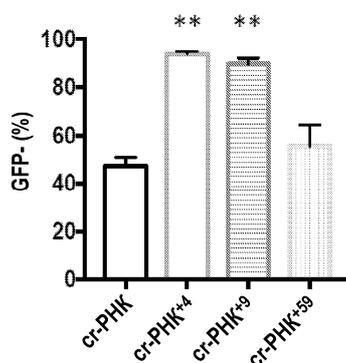
Фиг. 3A



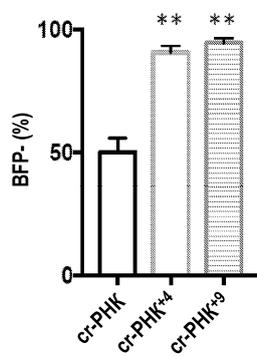
Фиг. 3В



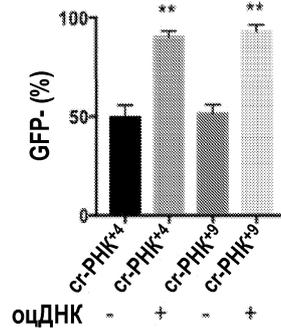
Фиг. 4А



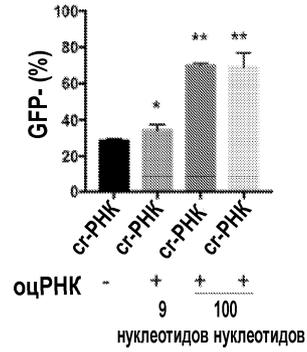
Фиг. 4В



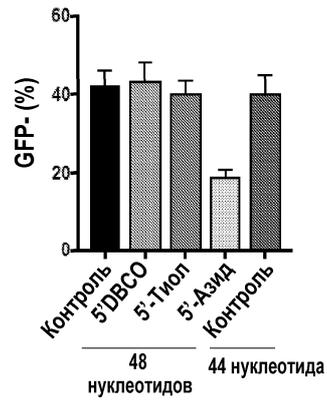
Фиг. 4С



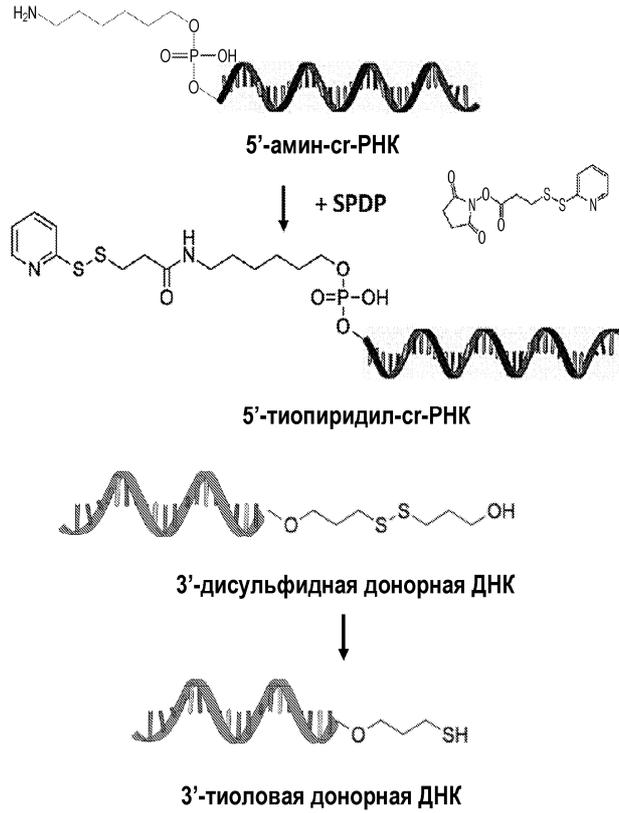
Фиг. 4D



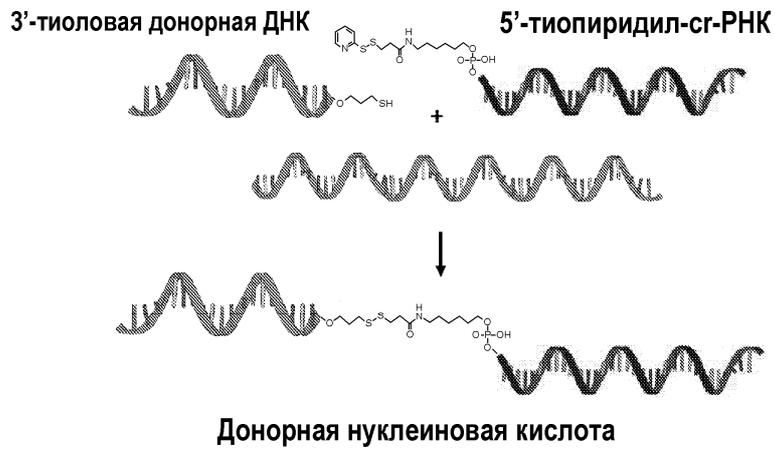
Фиг. 4E



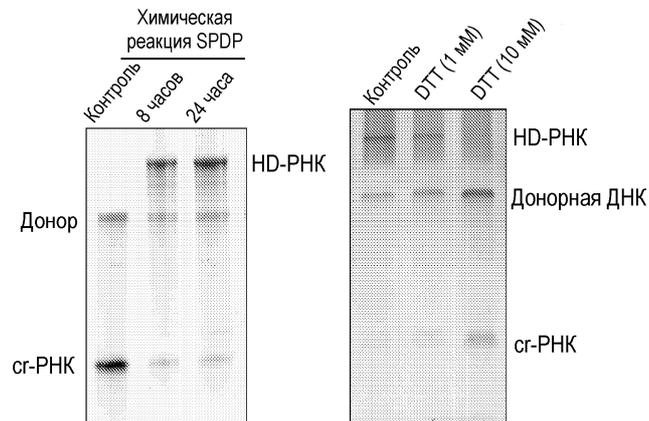
Фиг. 4F



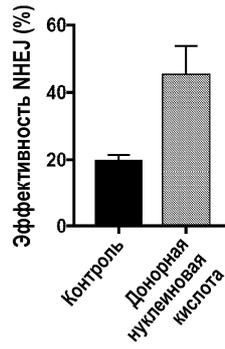
Фиг. 5А



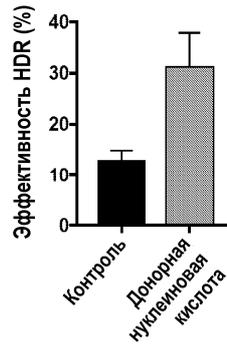
Фиг. 5В



Фиг. 5С



Фиг. 6



Фиг. 7

Бактерия *Francisella tilarensis* подвида *novicida* U112 Cpf1

```

1  msiiyqefvnk yslsktlrfe lipqgkltlen ikarglildd ekrakdykka kqiidkyhqf
61  fieeilssvc isedllqpnv dvyfklkksd ddnlgkdfks akdtikkqis eyikdsekfk
121 nlfngnlida kkgqesdlil wlqskdngi elfkansdit didealeiik sfkgwttfyk
181 gfhenrkxvy ssndiptsii yrivddnlpk flenkakyes lkdkapeain yeqikkdlae
241 eltfdidykt sevnqrvfsl devfeianfn nylngsgitk fntiiggkfv ngentkrkqi
301 neyinlysqq indktlkkyk msvlflkqiis dtesksfvid kledsdsvvt tmqsfyegia
361 afktveeksi ketlslldfd lkaqkldlsl iyfkndkslt dlsqqvfddy svigtavley
421 itqqiapknl dnpskkeqel iakktekaky lsletiklal eefnkhrdid kqcrfeeila
481 nfaaipmifd eiaqkdnla qisikyqngg kkdllqasae ddvkaikdli dqtnnlhkl
541 kifhisqsed kanildkdeh fylvfeecyf elanivplyn kirnyitqkp ysdekfklmf
601 enstlangwd knkepntai lfikddkyyl gvmnkknki fddkaikenk gegykkivyk
661 llpgankmlp kvffsaksik fynpsedilr imhsthtkn gspqkyekf efniedcrkf
721 idfykqsisk hpewkdfgfr fsdtqrynsi defyrevenq gykltfenis esyidsvvnq
781 gklylfiqyn kdfsayskgr pnlhtlywka lfdernlqdv vyklngeael fyrkqsipkk
841 ithpakeaia nknkdnpkke svfeydlikd krftedkfff hcpitinfks sgankfndei
901 nlllkekand vhilsidrge rhllyytlvd gkgniikqdt fniigndrmk tnyhdklaai
961 ekdrdsarkd wkkinnikem kegylsqvvh eiaklvieyn aivvfedlnf gfkrgfrkve
1021 kqvvyqklekm lieklnylvf kdnefdktgg vlrayqitap fetfkkmgkq tgiiyyvpag
1081 itskicpvtg fvnqlypkye svksqeffs kfdkicynd kgyfefsfdy knfgdkaakg
1141 kwitiasfgsr linfrnsdkn hnwdtrevyp tkelekllkd ysieyghgec ikaaicgesd
1201 kkffakltsv lncilqmns ktgteldyli spvadvngnf fdsrqapknm pqdadangay
1261 hqglkqlml l griknnqegk klnlviknee yfefvqnrnn (SEQ ID NO: 1)

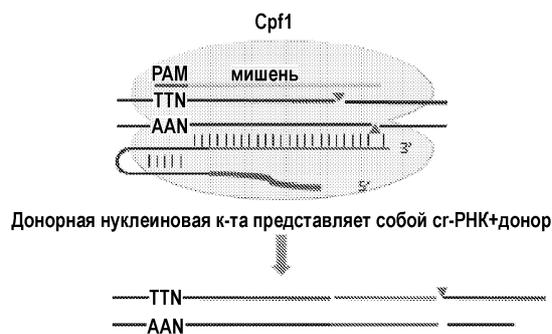
```

Фиг. 8

Последовательности прямых повторов ортологов (5'-3')

Тип/ Вид	Последовательность процессинга	Последовательность сг-РНК Crp1
FnCrp1	GUCUAGAACUUUAAA (SEQ ID NO: 2)	AAUUUCUACU-GUUGUAGAU (SEQ ID NO: 21)
AsCrp1	GUCAAAAGACUUUUU (SEQ ID NO: 3)	AAUUUCUACUC-UUGUAGAU (SEQ ID NO: 22)
LbCrp1	GUUUCAAAGAUUAAA (SEQ ID NO: 4)	AAUUUCUACUAAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 23)
TsCrp1	CUCUAGCAGGCCUGGCA (SEQ ID NO: 5)	AAUUUCUACU-GUUGUAGAU (SEQ ID NO: 24)
SaCrp1	AUUUGAAAGCAUUUU (SEQ ID NO: 6)	AAUUUCUACU-AUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25)
Pb2Crp1	GGCUAUAAGCUUAAA (SEQ ID NO: 7)	AAUUUCUACU-AUUGUAGAU (SEQ ID NO: 26)
PgCrp1	GCCAAUACCUCUAAA (SEQ ID NO: 8)	AAUUUCUACU-UUUGUAGAU (SEQ ID NO: 27)
MIcCrp1	GUCUAAACUACUUUU (SEQ ID NO: 9)	AAUUUCUACUGUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 28)
Mb2Crp1	GUCUAAACUACUUUU (SEQ ID NO: 10)	AAUUUCUACUGUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 29)
Mb3Crp1	GUCUAAACUACUUUU (SEQ ID NO: 11)	AAUUUCUACUGUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 30)
Lb4Crp1	CUCUAAUAAGAGUAUG (SEQ ID NO: 12)	AAUUUCUACU-GUUGUAGAU (SEQ ID NO: 31)
Lb5Crp1	UGCUUAGAACAUUAAA (SEQ ID NO: 13)	AAUUUCUACU-AUUGUAGAU (SEQ ID NO: 32)
FbCrp1	GUUAAAACCACUUUAAA (SEQ ID NO: 14)	AAUUUCUACU-AUUGUAGAU (SEQ ID NO: 33)
CRbCrp1	CUCUACAACUGAUAAGA (SEQ ID NO: 15)	AAUUUCUACU-UUUGUAGAU (SEQ ID NO: 34)
CPbCrp1	GUUAAAAGUCCUAUUG (SEQ ID NO: 16)	AAUUUCUACU-UUUGUAGAU (SEQ ID NO: 35)
CMaCrp1	GUCUAAAACUCAUUCAG (SEQ ID NO: 17)	AAUUUCUACU-AGUGUAGAU (SEQ ID NO: 36)
BsCrp1	UGCUUAGUACUUAUAAA (SEQ ID NO: 18)	AAUUUCUACU-AUUGUAGAU (SEQ ID NO: 37)
BfCrp1	GCCAAGAACCUAUAGAU (SEQ ID NO: 19)	AAUUUCUACU-GUUGUAGAU (SEQ ID NO: 38)
VoCrp1	GUCUUAAGACAUUUA (SEQ ID NO: 20)	AAUUUCUACU-AUUGUAGAU (SEQ ID NO: 39)

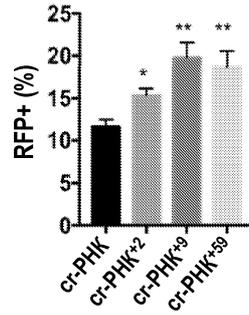
Фиг. 9



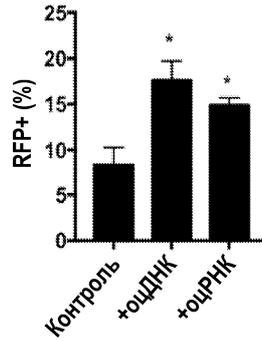
Фиг. 10А



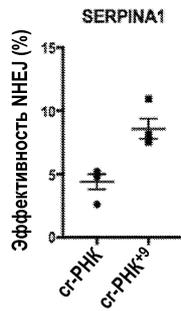
Фиг. 10В



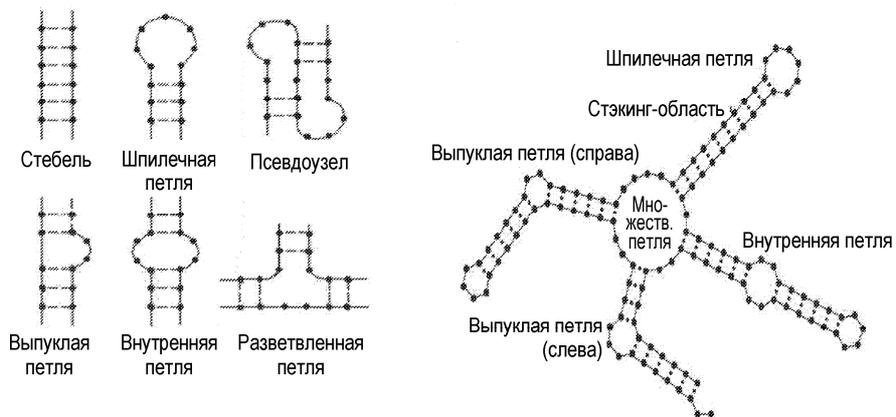
Фиг. 10С



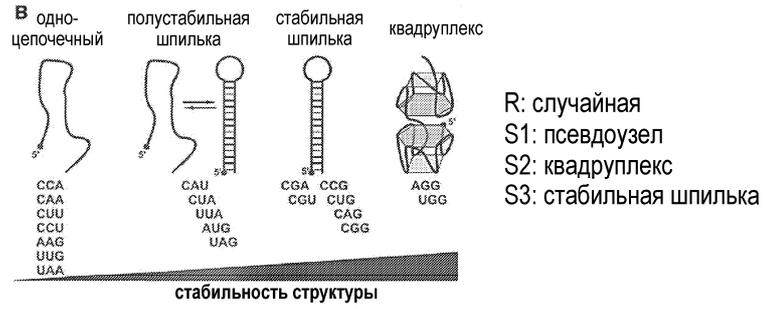
Фиг. 10D



Фиг. 10E



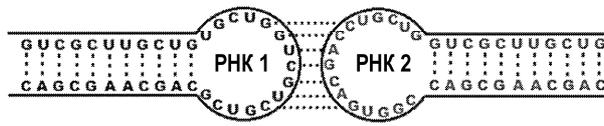
Фиг. 11А



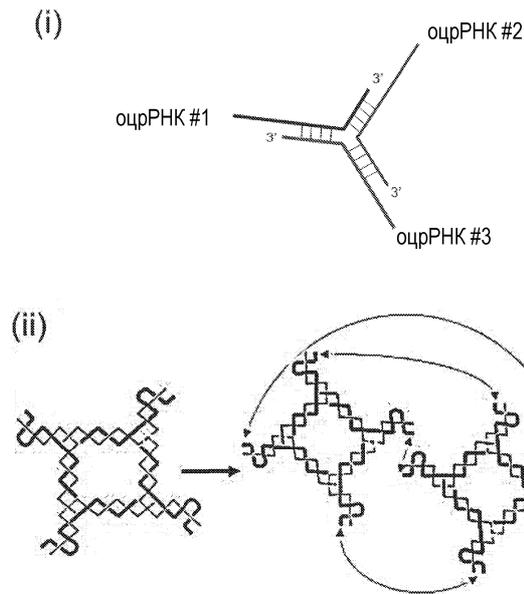
Тринуклеотидные повторы

Фиг. 11В

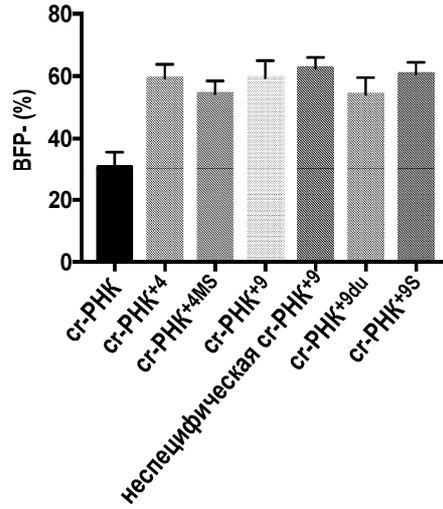
Комплекс «контактирующие петли»



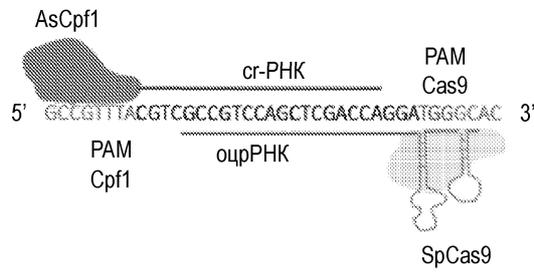
Фиг. 11С



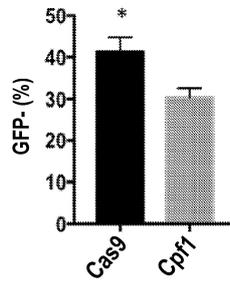
Фиг. 11D



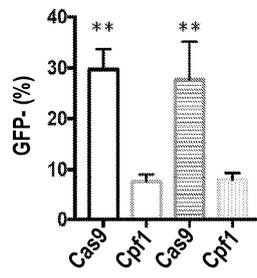
Фиг. 12



Фиг. 13А

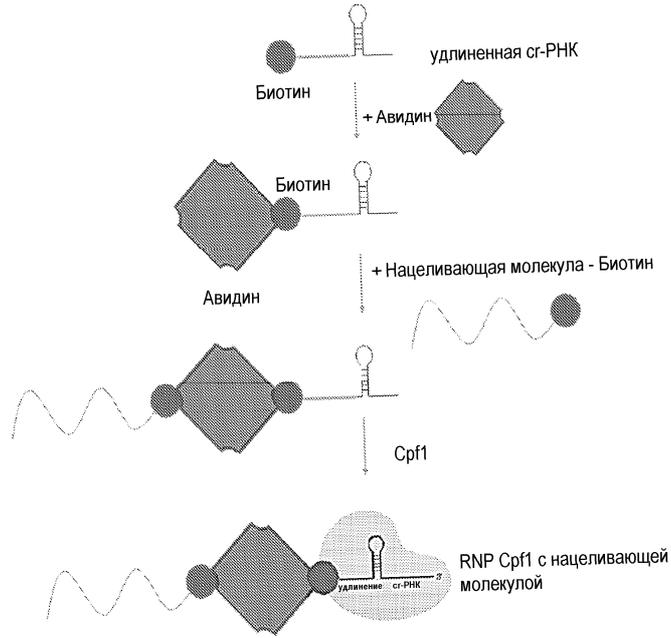


Фиг. 13В

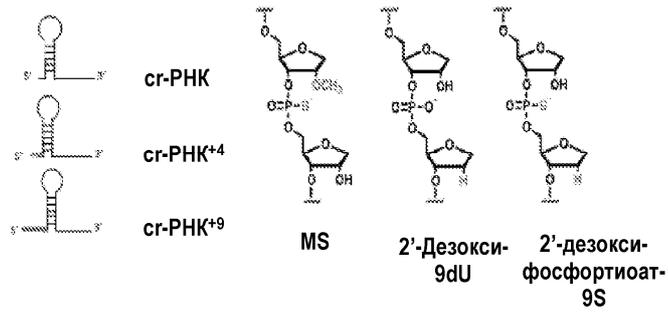


Липофектамин RNAiMAX 2000

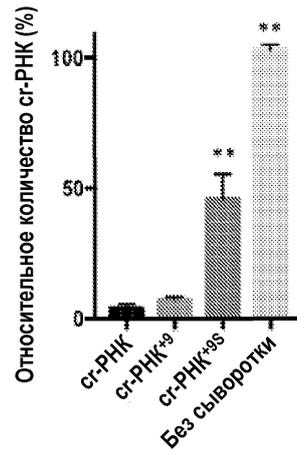
Фиг. 13С



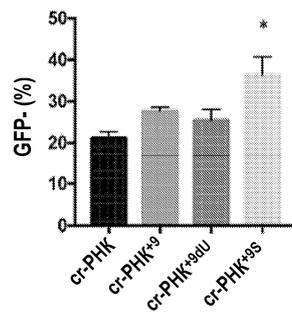
Фиг. 14



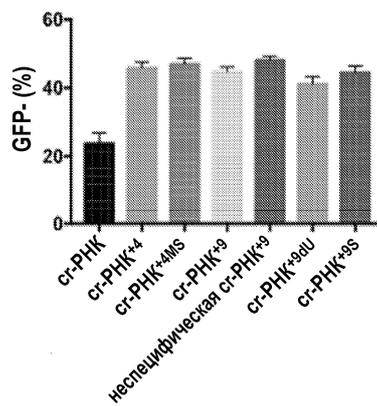
Фиг. 15A



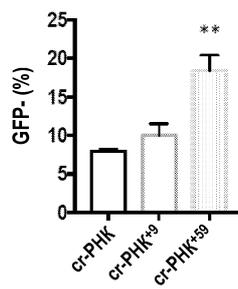
Фиг. 15B



Фиг. 15С



Фиг. 15D



Фиг. 16