

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2019121801, 14.12.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.12.2016 US 62/434,344;
06.01.2017 US 62/443,522;
06.01.2017 US 62/443,567;
09.06.2017 US 62/517,346

(43) Дата публикации заявки: 15.01.2021 Бюл. № 2

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.07.2019(86) Заявка РСТ:
US 2017/066545 (14.12.2017)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/112282 (21.06.2018)Адрес для переписки:
101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 5, ООО
"Союзпатент", С.Б. Фелициной(71) Заявитель(и):
ЛИГАНДАЛ, ИНК. (US)(72) Автор(ы):
БАТСОН, Андре Рональд (US),
ФОСТЕР, Кристиан (US)

A

1

2019121801

RU

RU

2019121801

A

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ПОЛЕЗНОЙ НАГРУЗКИ В ВИДЕ
НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И/ИЛИ БЕЛКА

(57) Формула изобретения

1. Наночастица, содержащая ядро и сбрасываемый слой, инкапсулирующий указанное ядро, причем ядро содержит

- (i) анионную полимерную композицию;
- (ii) катионную полимерную композицию;
- (iii) катионную полипептидную композицию; и
- (iv) полезную нагрузку в виде нуклеиновой кислоты и/или белка,

при этом (а) указанная анионная полимерная композиция содержит полимеры D-изомеров анионной аминокислоты и полимеры L-изомеров анионной аминокислоты; и/или (б) указанная катионная полимерная композиция содержит полимеры D-изомеров катионной аминокислоты и полимеры L-изомеров катионной аминокислоты.

2. Наночастица по п. 1, отличающаяся тем, что указанная анионная полимерная композиция содержит первый анионный полимер, выбранный из поли(D-глутаминовой кислоты) (PDEA) и поли(D-аспаргиновой кислоты) (PDDA); и содержит второй анионный полимер, выбранный из поли(L-глутаминовой кислоты) (PLEA) и поли(L-аспаргиновой кислоты) (PLDA).

3. Наночастица по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что указанная катионная

полимерная композиция содержит первый катионный полимер, выбранный из поли(D-аргинина), поли(D-лизина), поли(D-гистидина), поли(D-орнитина) и поли(D-цитруллина); и содержит второй катионный полимер, выбранный из поли(L-аргинина), поли(L-лизина), поли(L-гистидина), поли(L-орнитина) и поли(L-цитруллина).

4. Наночастица по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что указанные полимеры D-изомеров анионной аминокислоты присутствуют в соотношении с указанными полимерами L-изомеров анионной аминокислоты в диапазоне от 10:1 до 1:10.

5. Наночастица по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что указанные полимеры D-изомеров катионной аминокислоты присутствуют в соотношении с указанными полимерами L-изомеров катионной аминокислоты в диапазоне от 10:1 до 1:10.

6. Наночастица по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что сбрасываемый слой представляет собой анионное покрытие.

7. Наночастица по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что сбрасываемый слой чувствителен к pH и/или глутатиону.

8. Наночастица по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что сбрасываемый слой содержит один или несколько из: диоксида кремния, пептоида, полицистеина, кальция, фосфата кальция, сульфата кальция, марганца, фосфата марганца, сульфата марганца, магния, фосфата магния, сульфата магния, железа, фосфата железа, сульфата железа, лития, фосфата лития и сульфата лития.

9. Наночастица по п. 8, отличающаяся тем, что сбрасываемый слой представляет собой покрытие из диоксида кремния.

10. Наночастица по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что дополнительно содержит поверхностное покрытие, окружающее сбрасываемый слой.

11. Наночастица по п. 10, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит катионный компонент, который электростатически взаимодействует со сбрасываемым слоем.

12. Наночастица по п. 10 или 11, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит один или несколько из следующих компонентов: полимер катионной аминокислоты, поли(аргинин), якорный домен, катионный якорный домен, проникающий в клетки пептид, вирусный гликопротеин, протеогликан гепарансульфат и нацеливающий лиганд.

13. Наночастица по любому из пп. 10-12, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие является цвиттерионным и мультивалентным.

14. Наночастица по любому из пп. 10-13, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит один или несколько нацеливающих лигандов.

15. Наночастица по п. 14, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из одного или нескольких нацеливающих лигандов конъюгирован с якорным доменом, который взаимодействует со сбрасываемым слоем.

16. Наночастица по п. 15, отличающаяся тем, что якорный домен представляет собой катионный якорный домен, выбранный из RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 15) и НННННН (SEQ ID NO: 16).

17. Наночастица по п. 15 или 16, отличающаяся тем, что якорный домен конъюгирован с по меньшей мере одним из одного или нескольких нацеливающих лигандов через linker.

18. Наночастица по п. 17, отличающаяся тем, что linker не является полипептидом.

19. Наночастица по п. 17, отличающаяся тем, что linker является полипептидом.

20. Наночастица по любому из пп. 17-19, отличающаяся тем, что linker конъюгирован с нацеливающим лигандом посредством сульфогидрильной химии или химии реакций с аминами, и/или linker конъюгирован с якорным доменом посредством сульфогидрильной химии или химии реакций с аминами.

21. Наночастица по любому из пп. 17-20, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один из одного или нескольких нацеливающих лигандов содержит остаток цистеина и конъюгирован с линкером через остаток цистеина.
22. Наночастица по любому из пп. 14-21, отличающаяся тем, что указанные один или несколько нацеливающих лигандов обеспечивают целевое связывание с рецептором, сопряженным с семейством В G-белков (GPCR).
23. Наночастица по п. 22, отличающаяся тем, что указанный нацеливающий лиганд содержит замену цистеина в одном или нескольких внутренних положениях аминокислот по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа.
24. Наночастица по п. 22 или п. 23, отличающаяся тем, что указанный нацеливающий лиганд содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% или больше идентичности с аминокислотной последовательностью HGETFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS (SEQ ID NO:1).
25. Наночастица по п. 24, отличающаяся тем, что указанный нацеливающий лиганд содержит замену цистеина в одном или нескольких из положений L10, S11 и K12 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1.
26. Наночастица по п. 25, отличающаяся тем, что указанный нацеливающий лиганд содержит аминокислотную последовательность HGETFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 2).
27. Наночастица по любому из пп. 14-26, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит один или несколько нацеливающих лигандов, обеспечивающих целевое связывание с белком клеточной поверхности, выбранным из с-Kit, CD27 и CD150.
28. Наночастица по любому из пп. 14-27, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит один или несколько нацеливающих лигандов, выбранных из группы, состоящей из: фрагмента гликопroteина вируса бешенства (RVG), ApoE-трансферрина, лактоферрина, меланоферритина, овотрансферритина, L-селектина, Е-селектина, Р-селектина, PSGL-1, ESL-1, CD44, рецептора смерти-3 (DR3), LAMP1, LAMP2, Mac2-BP, фактора стволовых клеток (SCF), CD70, белка 1A, содержащего домен SH2 (SH2D1A), эксендина-4, GLP1, нацеливающего лиганда, который нацелен на $\alpha 5\beta 1$, RGD, лиганда трансферрина, фрагмента FGF, янтарной кислоты, бисфосфоната, CD90, CD45f, CD34, хемотактического липида гемопоэтических стволовых клеток, сфингозина, церамида, сфингозин-1-фосфата, церамид-1-фосфата и активного нацеливающего фрагмента любого из вышеуказанного.
29. Наночастица по любому из пп. 14-28, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит фактор стволовых клеток (SCF) или его нацеливающий фрагмент, CD70 или его нацеливающий фрагмент, и белок 1A, содержащий домен SH2 (SH2D1A), или его нацеливающий фрагмент.
30. Наночастица по любому из пп. 14-29, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит один или несколько нацеливающих лигандов, которые обеспечивают целевое связывание с клетками-мишениями, выбранными из: клеток костного мозга, гемопоэтических стволовых клеток (HSC), гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC), мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), миелоидных клеток-предшественников, лимфоидных клеток-предшественников, Т-клеток, В-клеток, NKT-клеток (естественных киллерных Т-клеток), NK-клеток (естественных киллерных клеток), дендритных клеток, моноцитов, гранулоцитов, эритроцитов, мегакариоцитов, тучных клеток, базофилов, эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов, эритроидных клеток-предшественников, мегакариоцитарно-эритроидных клеток-предшественников (МЕР), общих миелоидных клеток-предшественников (СМР), мультипотентных клеток-предшественников (МРР), гемопоэтических стволовых клеток

(HSC), краткосрочных HSC (ST-HSC), IT-HSC (промежуточных HSC), долгосрочных HSC (LT-HSC), эндотелиальных клеток, нейронов, астроцитов, клеток поджелудочной железы, β -островковых клеток поджелудочной железы, клеток печени, клеток мышц, клеток скелетных мышц, клеток сердечной мышцы, клеток печени, жировых клеток, клеток кишечника, клеток толстой кишки и клеток желудка.

31. Наночастица по любому из пп. 14-29, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит два или более нацеливающих лиганда, комбинация которых обеспечивает целевое связывание с клетками, выбранными из: клеток костного мозга, гемопоэтических стволовых клеток (HSC), гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC), мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), миелоидных клеток-предшественников, лимфоидных клеток-предшественников, Т-клеток, В-клеток, NKT-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, моноцитов, гранулоцитов, эритроцитов, мегакариоцитов, тучных клеток, базофилов, эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов, эритроидных клеток-предшественников, мегакариоцитарно-эритроидных клеток-предшественников (МЕР), общих миелоидных клеток-предшественников (CMP), мультипотентных клеток-предшественников (MPP), гемопоэтических стволовых клеток (HSC), краткосрочных клеток (ST-HSC), IT-HSC (промежуточных HSC), долгосрочных HSC (LT-HSC), эндотелиальных клеток, нейронов, астроцитов, клеток поджелудочной железы, β -островковых клеток поджелудочной железы, клеток печени, мышечных клеток, клеток скелетных мышц, клеток сердечной мышцы, клеток печени, жировых клеток, клеток кишечника, клеток толстой кишки и клеток желудка.

32. Наночастица по любому из пп. 1-31, отличающаяся тем, что катионная полипептидная композиция содержит полипептид, содержащий сигнал ядерной локализации (NLS).

33. Наночастица по п. 32, отличающаяся тем, что NLS содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 151-157 и 201-264.

34. Наночастица по любому из пп. 1-33, отличающаяся тем, что катионная полипептидная композиция содержит пептид гистонового хвоста (HTP).

35. Наночастица по п. 34, отличающаяся тем, что HTP конъюгирован с катионным аминокислотным полимером.

36. Наночастица по п. 35, отличающаяся тем, что HTP конъюгирован с катионным аминокислотным полимером через остаток цистеина.

37. Наночастица по п. 35 или 36, отличающаяся тем, что катионный аминокислотный полимер включает поли(лизин).

38. Наночастица по любому из пп. 33-37, отличающаяся тем, что указанная катионная полипептидная композиция содержит гистоновые пептиды, имеющие разветвленную структуру.

39. Наночастица по любому из пп. 1-38, отличающаяся тем, что доставляемая полезная нагрузка содержит одну или несколько из: (i) направляющей РНК CRISPR/Cas, (ii) молекулы ДНК, кодирующей направляющую РНК CRISPR/Cas, (iii) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, направляемый РНК CRISPR/Cas, (iv) полипептида, направляемого РНК CRISPR/Cas, (v) комплекса направляющей РНК CRISPR/Cas с полипептидом, направляемым РНК CRISPR/Cas, (vi) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок цинкового пальца (ZFP), (vii) ZFP, (viii) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей эффекторный белка эфектора, подобного активатору транскрипции (TALE), (ix) белка TALE, и (x) матрицы донорной ДНК.

40. Наночастица по любому из пп. 1-39, отличающаяся тем, что доставляемая полезная нагрузка содержит (i) направляющую РНК CRISPR/Cas и/или молекулу ДНК, кодирующую указанную направляющую РНК CRISPR/Cas; и (ii) полипептид, направляемый РНК CRISPR/Cas, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую

указанный полипептид, направляемый РНК CRISPR/Cas.

41. Наночастица по п. 40, отличающаяся тем, что доставляемая полезная нагрузка дополнительно содержит матрицу донорной ДНК.

42. Композиция наночастиц, содержащая:

(а) первую наночастицу по любому из пп. 1-41, отличающуюся тем, что доставляемая полезная нагрузка содержит одну или несколько из: (i) направляющей РНК CRISPR/Cas, (ii) молекулы ДНК, кодирующей направляющую РНК CRISPR/Cas, (iii) молекулы нукleinовой кислоты, кодирующей полипептид, направляемый РНК CRISPR/Cas, (iv) полипептида, направляемого РНК CRISPR/Cas, (v) направляющей РНК CRISPR/Cas в комплексе с полипептидом, направляемым РНК CRISPR/Cas, (vi) молекулы нукleinовой кислоты, кодирующей белок цинкового пальца (ZFP), (vii) ZFP, (viii) молекулы нукleinовой кислоты, кодирующей эффекторный белок, подобный активатору транскрипции (TALE), и (ix) белка TALE; и

(b) вторую наночастицу, содержащую полезную нагрузку в виде нукleinовой кислоты, которая содержит матрицу донорной ДНК.

43. Многослойная наночастица, содержащая:

(а) внутреннее ядро, содержащее полезную нагрузку, содержащую матрицу донорной ДНК;

(b) первый сбрасываемый слой, окружающий внутреннее ядро;

(c) промежуточное ядро, окружающее первый сбрасываемый слой, причем промежуточное ядро содержит одну или несколько из: (i) направляющей РНК CRISPR/Cas, (ii) молекулы ДНК, кодирующей направляющую РНК CRISPR/Cas, (iii) молекулы нукleinовой кислоты, кодирующей полипептид, направляемый РНК CRISPR/Cas, (iv) полипептида, направляемого РНК CRISPR/Cas, (v) направляющей РНК CRISPR/Cas в комплексе с полипептидом, направляемым РНК CRISPR/Cas, (vi) белка цинкового пальца (ZFP), (vii) молекулы ДНК, кодирующей ZFP, (viii) белка эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE), и (ix) молекулы ДНК, кодирующей белок TALE; и

(d) второй сбрасываемый слой, окружающий промежуточное ядро.

44. Многослойная наночастица по п. 43, отличающаяся тем, что первый и/или второй сбрасываемый слой содержит что-то одно или несколько из: диоксида кремния, пептоида, полицистеина, кальция, фосфата кальция, сульфата кальция, марганца, фосфата марганца, сульфата марганца, магния, фосфата магния, сульфата магния, железа, фосфата железа, сульфата железа, лития, фосфата лития и сульфата лития.

45. Многослойная наночастица по п. 43 или 44, отличающаяся тем, что содержит поверхностное покрытие, окружающее второй сбрасываемый слой.

46. Многослойная наночастица по п. 45, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит катионный компонент, который электростатически взаимодействует со вторым сбрасываемым слоем.

47. Многослойная наночастица по п. 45 или 46, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит один или несколько из: полимера катионной аминокислоты, поли(аргинина), пептида, проникающего в клетки, вирусного гликопротеина, протеогликана гепарансульфата и нацеливающего лиганда.

48. Наночастица по любому из пп. 43-47, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие является цвиттерионным и мультивалентным.

49. Наночастица по любому из пп. 43-48, отличающаяся тем, что поверхностное покрытие содержит один или несколько нацеливающих лигандов.

50. Способ доставки полезной нагрузки в виде нукleinовой кислоты и/или белка к клетке-мишени, включающий:

контактирование эукариотической клетки-мишени с наночастицей по любому из пп. 1-41, композицией наночастиц по п. 42 и/или многослойной наночастицей по любому

из пп. 43-49.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что полезная нагрузка включает инструмент редактирования генов.

52. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что полезная нагрузка включает одно или несколько из: направляющей РНК CRISPR/Cas, молекулы ДНК, кодирующей направляющую РНК CRISPR/Cas, полипептида, направляемого РНК CRISPR/Cas, молекулы нукleinовой кислоты, кодирующей полипептид, направляемый РНК CRISPR/Cas, нуклеазы цинкового пальца, молекулы нукleinовой кислоты, кодирующей нуклеазу цинкового пальца, TALE или TALEN, молекулы нукleinовой кислоты, кодирующей TALE или TALEN, и матрицы донорной ДНК.

53. Способ по любому из пп. 50-52, отличающийся тем, что клетка-мишень представляет собой клетку млекопитающего.

54. Способ по любому из пп. 50-53, отличающийся тем, что клетка-мишень представляет собой клетку человека.

55. Способ по любому из пп. 50-54, отличающийся тем, что клетка-мишень находится в культуре *in vitro*.

56. Способ по любому из пп. 50-54, отличающийся тем, что клетка-мишень находится в условиях *in vivo*.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что указанное контактирование включает стадию введения наночастицы индивидууму.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что индивидуум имеет болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Паркинсона, рак поджелудочной железы, диабет или болезнь фон Виллебранда.

59. Способ по любому из пп. 50-58, отличающийся тем, что наночастица включает поверхностный слой, содержащий нацеливающий лиганд.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что нацеливающий лиганд обеспечивает связывание мишени с клетками, выбранными из: клеток костного мозга, гемопоэтических стволовых клеток (HSC), гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC), мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), миелоидных клеток-предшественников, лимфоидных клеток-предшественников, Т-клеток, В-клеток, NKT-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, моноцитов, гранулоцитов, эритроцитов, мегакариоцитов, тучных клеток, базофилов, эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов, эритроидных клеток-предшественников, мегакариоцитарно-эритроидных клеток-предшественников (МЕР), общих миелоидных клеток-предшественников (СМР), мультипотентных клеток-предшественников (МРР), гемопоэтических стволовых клеток (HSC), краткосрочных HSC (ST-HSC), IT-HSC (промежуточных HSC), долгосрочных HSC (LT-HSC), эндотелиальных клеток, нейронов, астроцитов, клеток поджелудочной железы, β -островковых клеток поджелудочной железы, клеток печени, мышечных клеток, клеток скелетных мышц, клеток сердечной мышцы, клеток печени, жировых клеток, клеток кишечника, клеток толстой кишки и клеток желудка.

61. Способ по любому из пп. 50-60, отличающийся тем, что клетку-мишень выбирают из клеток костного мозга, гемопоэтических стволовых клеток (HSC), гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC), мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), миелоидных клеток-предшественников, лимфоидных клеток-предшественников, Т-клеток, В-клеток, NKT-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, моноцитов, гранулоцитов, эритроцитов, мегакариоцитов, тучных клеток, базофилов, эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов, эритроидных клеток-предшественников, мегакариоцитарно-эритроидных клеток-предшественников (МЕР), общих миелоидных клеток-предшественников (СМР), мультипотентных клеток-предшественников (МРР), гемопоэтических стволовых клеток (HSC), краткосрочных

HSC (ST-HSC), IT-HSC (промежуточных HSC), долгосрочных HSC (LT-HSC), эндотелиальных клеток, нейронов, астроцитов, панкреатических клеток, β -островковых клеток поджелудочной железы, клеток печени, мышечных клеток, клеток скелетных мышц, клеток сердечной мышцы, гепатоцитов, жировых клеток, клеток кишечника, клеток толстой кишки и клеток желудка.

62. Разветвленная гистоновая молекула, содержащая: один или несколько пептидов гистоновых хвостов (HTP), конъюгированных с боковыми цепями катионного полимера.

63. Разветвленная гистоновая молекула по п. 62, отличающаяся тем, что катионный полимер включает поли(аргинин) или поли(лизин).

64. Разветвленная гистоновая молекула по п. 63, отличающаяся тем, что до 40% боковых цепей катионного полимера конъюгированы с указанными одним или большим количеством HTP.