

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990214 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2017.07.05

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ CRISPR/CAS9 И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 62/358,339

(32) 2016.07.05

(33) US

(86) PCT/US2017/040696

(87) WO 2018/009525 2018.01.11

(71) Заявитель:

ДЗЕ ДЖОНС ХОПКИНС
ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:

Джаскула-Ранга Винод, Зэк Дональд,
Банз Фред (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящей заявке описаны способы профилактики, ингибирования или лечения рака у индивидуума. Настоящее изобретение также относится к способам изменения уровня экспрессии одного или более генных продуктов в клетке, такой как раковая клетка. Такие способы могут включать применение модифицированной нуклеазной системы, такой как кластеризованные регулярно перемежающиеся короткие палиндромные повторы (CRISPR)/CRISPR-ассоциированная (Cas) 9 (CRISPR-Cas9), содержащие двунаправленный промотор H1 и рPHK, нацеленные на онкогены (гAAV-онко-CRISPR) или гены-супрессоры опухоли (гAAV-TSG), упакованные в компактную частицу аденоассоциированного вируса (AAV). Такие способы могут включать совместное или одновременное введение рекомбинантного аденовируса, упаковывающего аденоассоциированный вирус, вместе с нуклеазной системой.

A1

201990214

201990214

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-554577EA/032

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ CRISPR/CAS9 И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Перекрестная ссылка

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США No: 62/358339, поданной 5 июля 2016 г., содержание которой во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Заявление Федеральных Органов

Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке Правительства на грант №№ R01CA157535, выданный Национальным Институтом рака. Правительство имеет определенные права на это изобретение.

Предпосылки создания изобретения

Одной из основных проблем, не позволяющих осуществлять успешное и эффективное нацеливание на молекулу, ассоциированную с раком или рак-специфическую молекулу (например, ген, белок, фермент), является отсутствие ее специфичности. Современные химиотерапевтические средства и агенты при их преclinical исследовании обнаруживали эффективность в ингибировании выбранной молекулы, но не обладали специфичностью к мишени. По существу, это является главным причинным фактором возникновения нежелательных и побочных токсических эффектов, обычно вызываемых химиотерапевтическими средствами. Хотя стратегии генотерапии, такие как использование кшРНК или киРНК являются в высокой степени специфичными к молекулярной мишени, однако, их селективная доставка в опухоль представляет серьезную проблему. Кроме того, киРНК имеет ограниченную способность инактивировать или нейтрализовать мишень в отношении 1:1, которая была бы необходима для обеспечения постоянных и высоких уровней доставки специфической РНК в опухоль. С другой стороны, кшРНК, после ее введения в опухоль, может интегрироваться в геном хозяина и продуцировать непрерывные антисмысловые олигонуклеотиды, которые могут блокировать специфичность к мишени.

Преclinical отчеты указывают на то, что молекулярное нацеливание на раковую опухоль значительно повышает

терапевтическую эффективность (Gharwan, H. & Groninger, H. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2015)). Тем не менее, успешное клиническое применение большинства противоопухолевых агентов остается нерешенной проблемой (Rothenberg, ML *et al. Nat. Rev. Cancer.* 3, 303-309 (2003); Le Tourneau, C *et al. Target Oncol.* 5, 65-72 (2010)). Хотя способы терапии с использованием антисмысловых молекул на основе нуклеиновой кислоты (например, киРНК, кшРНК) являются превосходными в отношении молекулярной специфичности и эффективного ингибирования, однако, существуют определенные проблемы, препятствующие их успешному клиническому применению (Ganapathy-Kanniappan S *et al. Mol Cancer.* 2013; 12: 152,4598-12-152, Pecot, CV *et al. Nat. Rev. Cancer.* 11, 59-67 (2011)).

А поэтому, существует острая необходимость в разработке инновационных терапевтических стратегий и композиций с улучшенной специфичностью к мишени при лечении рака.

Сущность изобретения

Для практического осуществления настоящего изобретения обычно применяют, если это не оговорено особо, стандартные методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантных нуклеиновых кислот (например, ДНК), иммунологии и РНК-интерференции (РНКи), которые известны специалистам в данной области. Неограничивающие описания некоторых из этих методов можно найти в следующих публикациях: Ausubel, F., *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols in Immunology*, *Current Protocols in Protein Science*, and *Current Protocols in Cell Biology*, all John Wiley & Sons, N.Y., edition as of December 2008; Sambrook, Russell, and Sambrook, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. и Lane, D., *Antibodies-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988; Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique", 5th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 2005. Неограничивающую информацию, касающуюся терапевтических средств

и болезней человека, можно найти у Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., McGraw Hill, 2005, Katzung, B. (ed.) Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange 10th ed. (2006) или в 11-м издании (июль 2009). Неограничивающую информацию, касающуюся генов и генетических расстройств можно найти у McKusick, V. A.: Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12-е издание) или в более поздних базах данных онлайн: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) и на сайте Национального Центра биотехнологической информации, Национальной медицинской библиотеки (Bethesda, Md.), созданном 1 мая, 2010, и имеющимся в Интернете: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>, и в базе данных Менделевского наследования у животных онлайн (OMIA), то есть, в базе данных генов, наследуемых расстройств и признаков у животных различных видов (кроме человека и мышей), имеющейся в Интернете на сайте: <http://omia.angis.org.au/contact.shtml>. Все упомянутые здесь патенты, патентные заявки и другие публикации (например, научные статьи, книги, веб-сайты и базы данных) во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. В случае возникновения разночтений между настоящим описанием и другими включенными в него ссылками, следует отдать предпочтение информации, имеющейся в настоящем описании (включая любые исправления, которые могут быть внесены посредством ссылки). Используемые здесь термины имеют свои стандартные значения, если это не оговорено особо. Используемые здесь различные термины имеют стандартные аббревиатуры.

В настоящей заявке описаны способы лечения рака. В этих способах используется модифицированная нуклеазная система, такая как кластеризованные регулярно перемежающиеся короткие палиндромные повторы (CRISPR)/CRISPR-ассоциированная (Cas) 9 (CRISPR-Cas9), для терапевтического нацеливания на онкогенные мутации или для репарации дефектных генов-супрессоров опухоли.

Редактирование гена CRISPR-cas9 может быть использовано для инактивации или коррекция онкогенных мутаций, вызывающих рак, и, тем самым, для разработки метода генотерапии в целях устранения основных причин развития рака.

Таким образом, в одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу профилактики, ингибирования или лечения рака у индивидуума, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества нуклеазной системы (например, CRISPR-cas9), содержащей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок cas9) и руководящую РНК, содержащую по меньшей мере одну геномную последовательность-мишень, такую как онкогенная мутация (например, rAAV-онко-CRISPR) или ген-супрессор опухоли (например, rAAV-TSG). Этот способ может также включать совместное введение аденовируса, способного упаковывать рекомбинантные аденоассоциированные вирусы *in vivo* (например, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус; «Ad-rAAVpack») в комбинации или вместе с rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG, как описано в настоящей заявке.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способам профилактики, ингибирования или лечения рака, в которых используется композиция, содержащая модификацию не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, описанной ранее в заявке WO2015/195621 (которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). Такая модификация включает определенные рРНК, которые нацелены на раковые онкогенные мутации, такие как, но не ограничиваемые ими, KRAS, PIK3CA или IDH1, или мутации в генах-супрессорах опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция включает (а) не встречающуюся в природе нуклеазную систему (например, CRISPR-cas9), содержащую один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке индивидуума, и где молекула ДНК кодирует один или более генных продуктов,

экспрессирующихся в клетке; и ii) регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок cas9), где компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (например, Ad-rAAVpack), одновременно или совместно вводят с аденоассоциированным вирусом, содержащим нуклеазную систему. Ad-rAAVpack может быть также использован вместе с rAAV, который не кодирует систему нуклеаза-рРНК, а вместо этого кодирует ген, который будет стимулировать разрушение опухоли или улучшенное распознавание опухоли иммунной системой. Так, например, Ad-rAAVpack может регулировать упаковку партнера rAAV, который кодирует трансген, такой как интерферон- α или p53 дикого типа. Так, например, AAV-онко-CRISPR или AAV-TSG может быть доставлен отдельно или в тандеме с Ad-rAAVpack. В отличие от этого, Ad-rAAVpack может быть использован с любым rAAV, независимо того, сконструирован ли он для доставки нуклеазы-рРНК или нет. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазную систему упаковывают в частицу одного аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор включает: а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную на геном, в противоположном направлении.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способам модификации экспрессии одного или более генных продуктов в эукариотической клетке, где указанная клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более генных

продуктов, и где указанный включает введение в клетку модифицированной не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, описанной ранее в заявке WO2015/195621 (которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). Такая модификация включает определенные рРНК, которые нацелены на раковые онкогенные мутации, такие как, но не ограничивающиеся ими, KRAS, PIK3CA или IDH1, или мутации в генах-супрессорах опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанный способ включает введение в клетку композиции, содержащей (а) не встречающуюся в природе нуклеазную систему (например, CRISPR-cas9), содержащую один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке индивидуума, и где молекула ДНК кодирует один или более генных продуктов, экспрессирующихся в клетке; и ii) регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок cas9), где компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (например, Ad-rAAVpack), одновременно или совместно вводят с аденоассоциированным вирусом, содержащим нуклеазную систему. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазную систему упаковывают в частицу одного аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор включает: а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию

нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную на геном, в противоположном направлении.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу профилактики, ингибирования или лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный способ включает:

(a) получение не встречающейся в природе нуклеазной системы, содержащей один или более векторов, включающих: i) промотор, функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке индивидуума, и где молекула ДНК кодирует один или более онкогенных продуктов, экспрессирующихся в клетке; и ii) регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу, где компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов; и (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества этой системы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает стадию получения рекомбинантного аденовируса, упаковывающего аденоассоциированный вирус (Ad-rAAVpack).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Ad-rAAVpack вводят одновременно или вместе с нуклеазной системой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, такой системой является CRISPR-cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эту систему упаковывают в частицу одного аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, содержит по меньшей мере одну делецию в аденовирусном гене.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, выбран из аденовируса серотипа 2, аденовируса серотипа 5 или аденовируса серотипа 35.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, упаковывающим вирусом является аденовирус серотипа 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусный ген выбран из E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 или L5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусным геном является E3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта система инактивирует один или более генных продуктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну генную мутацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотором является промотор H1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор H1 является двунаправленным. Промотор H1 представляет собой промотор Pol II и Pol III.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор H1 включает: а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную на геном, в противоположном направлении.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазой, нацеленной на геном, является белок cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор функционально присоединен по меньшей мере к одной, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти рРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген или ген-супрессор

опухоли.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью является онкоген, содержащий по меньшей мере одну мутацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью является онкоген, выбранный из группы, состоящей из Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, AKT, с-мус, β -катенина, PDGF, С-МЕТ, PI3K-110a, CDK4, циклина B1, циклина D1, гена рецептора эстрогена, гена рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолога 1 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолога 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолога 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антигена PyV МТ и Т-антигена SV40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, выбранный из KRAS, PIK3CA или IDH1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является KRAS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, KRAS содержит мутацию, выбранную из G13D, G12C или G12D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14 или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является PIK3CA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, PIK3CA содержит мутацию, выбранную из E345K, D549N или H1047R.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18 или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,

последовательностью-мишенью является онкоген, который представляет собой IDH1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, IDH1 содержит мутацию R132H.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность рРНК выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-10, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазную систему вводят системно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, системное введение выбрано из группы, состоящей из перорального, внутривенного, интрадермального, внутрибрюшинного, подкожного и внутримышечного введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазную систему вводят вовнутрь опухоли или в участок возле опухоли.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму вводят по меньшей мере одно дополнительное противораковое средство.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, противораковое средство выбрано из группы, состоящей из паклитаксела, цисплатина, топотекана, гемцитабина, блеомицина, этопозида, карбоплатина, доцетаксела, доксорубицина, топотекана, циклофосамида, трабектедина, олапариба, тамоксифена, летрозола и бевацизумаба.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму проводят по меньшей мере одну дополнительную противораковую терапию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, противораковой терапией является лучевая терапия, химиотерапия или хирургическое вмешательство.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, раком является солидная опухоль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак выбран из группы, состоящей из рака головного мозга, рака желудочно-кишечного тракта, рака ротовой полости, рака молочной железы,

рака яичника, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, рака печени, рака горла, рака желудка и рака почек.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак представляет собой рак головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является млекопитающее.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является человек.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, пролиферацию клеток у индивидуума ингибируют или снижают.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, злокачественную опухоль у индивидуума ингибируют или снижают.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, некроз опухоли у индивидуума усиливают или повышают.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу изменения уровня экспрессии одного или более генных продуктов в клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более генных продуктов, где указанный способ включает введение в клетку: (i) не встречающейся в природе нуклеазной системы, содержащей один или более векторов, включающих: а) промотор, функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и

б) регуляторного элемента, действующего в клетке и функционально присоединенного к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу,

где компоненты (а) и (б) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает получение рекомбинантного аденовируса, упаковывающего аденоассоциированный вирус (Ad-rAAVpack).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Ad-rAAVpack вводят одновременно или вместе с нуклеазной системой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, такой системой является CRISPR-cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эту систему упаковывают в частицу одного аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, содержит по меньшей мере одну делецию в аденовирусном гене.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, выбран из аденовируса серотипа 2, аденовируса серотипа 5 или аденовируса серотипа 35.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирус, упаковывающий аденовирус, представляет собой аденовирус серотипа 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусный ген выбран из E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 или L5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусным геном является E3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта система инактивирует один или более генных продуктов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну генную мутацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотором является промотор H1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор H1 является двунаправленным.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор H1 включает: а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную

на геном, в противоположном направлении.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазой, нацеленной на геном, является белок cas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор функционально присоединен по меньшей мере к одной, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти рРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген или ген-супрессор опухоли.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является ген-драйвер рака, выбранный из группы, состоящей из EP300, FBXW7, GATA1, GATA2, NOTCH1, NOTCH2, EXT1, EXT2, PTCH1, SMO, SPOP, SUFU, APC, AXIN1, CDH1, CTNNB1, EP300, FAM123B, GNAS, HNF1A, NF2, PRKAR1A, RNF43, SOX9, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATRX, CREBBP, DNMT1, DNMT3A, EP300, EZH2, H3F3A, HIST1H3B, IDH1, IDH2, KDM5C, KDM6A, MEN1, MLL2, MLL3, NCOA3, NCOR1, PAX5, PBRM1, SETD2, SETBP1, SKP2, SMARCA4, SMARCB1, SPOP, TET2, WT1, AR, BCOR, CREBBP, DAXX, DICER1, GATA3, IKZF1, KLF4, LMO1, PHOX2B, PHF6, PRDM1, RUNX1, SBDS, SF3B1, SRSF2, U2AF1, ABL1, BCL2, CARD11, CASP8, CCND1, CDC73, CDK4, CDKN2A, CDKN2C, CYLD, DAXX, FUBP1, MDM2, MDM4, MED12, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NFE2L2, NPM1, PPM1D, PPP2R1A, RB1, TNFAIP3, TRAF7, TP53, ALK, B2M, BRAF, CBL, CEBPA, CSF1R, CIC, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, NRAS, NF1, PDGFRA, PTPN11, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, VHL, AKT1, ALK, B2M, CBL, CEBPA, CSF1R, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLCN, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, GPC3, KIT, MET, NKX21, PRKAR1A, PIK3CA, PIK3R1, PDGFRA, PTEN, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, STK11, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WAS, CRLF2, FGFR2, FGFR3, FLT3, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, MPL, SOCS1, VHL, B2M, CEBPA, ERK1, GNA11, GNAQ, MAP2K4, MAP3K1, NKX21, TNFAIP3, TSHR, WAS, ACVR1B, BMPR1A, FOXL2, GATA1, GATA2, GNAS, EP300, MED12, SMAD2, SMAD4, ATM, BAP1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BUB1B, CHEK2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, FANCA, FANCC, FANCD2,

FANCE, FANCF, FANCG, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBS1, PALB2, PMS1, PMS2, RECQL4, STAG2, TP53, WRN, XPA и XPC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью является онкоген, выбранный из группы, состоящей из Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, АКТ, с-мус, β -катенина, PDGF, С-МЕТ, PI3K-110a, CDK4, циклина B1, циклина D1, гена рецептора эстрогена, гена рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолога 1 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолога 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолога 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антигена PyV МТ и Т-антигена SV40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, выбранный из KRAS, PIK3CA или IDH1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является KRAS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, KRAS содержит мутацию, выбранную из G13D, G12C или G12D.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14 или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является PIK3CA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, PIK3CA содержит мутацию, выбранную из E345K, D549N или H1047R.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18 или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью является онкоген, который представляет собой IDH1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, IDH1 содержит мутацию R132H.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность рРНК выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-10 или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия одного или более генных продуктов является пониженной.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеткой является эукариотическая или не-эукариотическая клетка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эукариотической клеткой является клетка млекопитающего или человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, эукариотической клеткой является раковая клетка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, пролиферация этих клеток ингибируется или снижается.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, апоптоз этих клеток усиливается или повышается.

Некоторые аспекты рассматриваемого здесь предмета изобретения, заявленные выше, частично или полностью входят в объем описанного предмета изобретения, а другие аспекты будут очевидны по мере изложения сущности изобретения вместе с прилагаемыми ниже примерами и чертежами, где приводятся наилучшие варианты осуществления изобретения.

Краткое описание чертежей

При раскрытии описанного здесь предмета изобретения используются общие термины со ссылками на чертежи, которые, необязательно, приводятся с соблюдением масштаба, где:

На фиг. 1 показана взаимосвязь между Ad и AAV. AAV дикого типа могут реплицироваться только в Ad-инфицированных клетках. Компактный одноцепочечный геном ДНК AAV дикого типа содержит два гена (справа), фланкированных инвертированными концевыми повторами (ITR). Остальные генетические элементы, необходимые для репликации AAV, представлены как Ad в транс-ориентации. Ad дикого типа вызывает самоограничивающиеся литические инфекции, а

модифицированные вирусы часто используются в качестве векторов для доставки трансгенов.

На фиг. 2 показана система доставки на основе двух вирусных генов. Рекомбинантный вирус Ad-rAAVpack экспрессирует *rep* и *cap* AAV, а также другие транс-факторы, необходимые для репликации AAV. Таким образом, Ad-rAAVpack способствует репликации *in vivo* совместного инфицированных rAAV. Этот партнер rAAV может быть снабжен элементами CRISPR-cas9 или трансгенами, такими как супрессоры опухолей. Система из двух вирусов может быть использована для репликации rAAV любого типа *in vivo*.

На фиг. 3 показана система из двух вирусов для проведения онколитической терапии. Ad-rAAVpack применяется для лечения опухоли вместе с партнером rAAV, запрограммированным так, чтобы он нацеливался на опухоль-специфическую драйвер-мутацию. rAAV не будет оказывать никакого воздействия на опухоли, которые не содержат такую мутацию. Из-за ограничения круга хозяев, у которых имеется мутация E1B, Ad-rAAVpack будет селективно реплицироваться в клетках опухоли. Было показано, что некоторые мутации в E1B сообщают такое ограничение по кругу хозяев. В некоторых вариантах осуществления изобретения используются четыре аминокислотных мутации, обозначаемые sub19 (Chahal et al. (2013) 87:4432-44. Клетки, продуктивно инфицированные Ad-rAAVpack, будут подвергаться лизису, что будет способствовать введению новых реплицированных Ad-rAAVpack и rAAV в локальное окружение. Рост клеток, инфицированных только rAAV, будет тормозиться из-за потери гена-драйвера. Такие клетки могут повышать иммуногенность опухоли.

На фиг. 4 представлены три панели, А, В, и С, где проиллюстрировано использование РНК-направленных нуклеаз для инактивации онкогенного KRAS.

На фиг. 5 представлены две панели, А и В, где проиллюстрировано использование РНК-направленных нуклеаз для инактивации онкогенного PIK3CA.

Подробное описание изобретения

Раскрываемый здесь предмет изобретения более подробно описан ниже со ссылкой на прилагаемые чертежи, где представлены

некоторые, но не все варианты раскрываемого здесь предмета изобретения. Указанные номера соответствуют элементам, представленным во всем описании изобретения. Раскрываемый здесь предмет изобретения может быть представлен во многих различных формах и не должен ограничиваться представленными здесь вариантами, однако, эти варианты должны быть представлены в форме, удовлетворяющей существующим юридическим требованиям. Действительно, многие модификации и другие варианты раскрываемого здесь предмета изобретения, указанного в настоящей заявке, будут понятны специалисту в области, к которой относится раскрываемый здесь предмет изобретения, и преимущества этих вариантов будут очевидны из описания, представленного выше и на прилагаемых чертежах. Таким образом, очевидно, что раскрываемый здесь предмет изобретения не ограничивается конкретно описанными здесь вариантами, и в него могут быть внесены модификации и другие варианты, не выходящие за рамки объема прилагаемой формулы изобретения.

Технологии редактирования генома, в которых используются такие компоненты, как нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN) (Porteus, and Baltimore (2003) *Science* 300: 763; Miller et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:778-785; Sander et al. (2011) *Nature Methods* 8:67-69; Wood et al. (2011) *Science* 333:307) и эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN) (Wood et al. (2011) *Science* 333:307; Boch et al. (2009) *Science* 326:1509-1512; Moscou and Bogdanove (2009) *Science* 326:1501; Christian et al. (2010) *Genetics* 186:757-761; Miller et al. (2011) *Nat. Biotechnol.* 29:143-148; Zhang et al. (2011) *Nat. Biotechnol.* 29:149-153; Reyon et al. (2012) *Nat. Biotechnol.* 30:460-465), позволяют генерировать целевые геномные модификации и точно скорректировать мутации, приводящие к развитию заболевания. Хотя эти технологии являются эффективными, однако, они имеют практические ограничения, поскольку пары ZFN и TALEN требуют синтеза крупных и уникальных белков, распознающих конкретный сайт ДНК-мишени. Недавно некоторые группы ученых сообщили о высокоэффективном редактировании генома с использованием сконструированной системы CRISPR/Cas9 типа II, которая позволит

решить эти ключевые проблемы (Cong et al. (2013) *Science* 339:819-823; Jinek et al. (2013) *eLife* 2:e00471; Mali et al. (2013) *Science* 339:823-826; Cho et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:230-232; Hwang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:227-229). В отличие от ZFN и TALEN, генерирование которых занимает относительно много времени и является трудоемким, конструкции CRISPR, которые основаны на нуклеазной активности белка Cas9, связанного с синтетической направляющей РНК (gРНК), могут быть синтезированы проще и быстрее и могут быть мультиплексными. Однако, несмотря на относительную простоту их синтеза, CRISPR имеют технологические ограничения в отношении их доступа к целевым геномным областям, что зависит от свойств самого Cas9 и синтеза его gРНК.

Для расщепления под действием системы CRISPR необходимо спаривание комплементарных оснований gРНК с последовательностью ДНК из 20 нуклеотидов и присутствие мотива, смежного с протоспейсером (PAM), то есть, короткого нуклеотидного мотива, присутствующего со стороны 3'-конца по отношению к сайту-мишени (Jinek et al. (2012) *Science* 337: 816-821). Теоретически, нацеливание на любую уникальную последовательность N₂₀-PAM в геноме может быть осуществлено с применением технологии CRISPR. Одним из недостатков такой технологии является то, что специфичность связывания ДНК с последовательностью PAM варьируется в зависимости от вида, от которого происходит конкретно используемая Cas9. В настоящее время известно, что наиболее распространенный и чаще всего используемый белок Cas9 происходит от *S. pyogenes* и распознает последовательность NGG, а поэтому, мишенью может быть любая уникальная последовательность из 21 нуклеотида в геноме, за которой следуют два гуанозинового нуклеотида (N₂₀NGG). Расширение доступного пространства для нацеливания, сообщаемое белковым компонентом, ограничивается возможностью обнаружения и использования новых белков Cas9 с измененными требованиями к PAM (Cong et al. (2013) *Science* 339: 819-823; Hou et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(39):15644-9), или проблемой, связанной с продуцированием новых

вариантов Cas9 посредством мутагенеза или направленной эволюции. Второй технологический недостаток системы CRISPR заключается в инициации экспрессии рРНК у 5'-гуанозинового нуклеотида. Использование промоторов РНК-полимеразы класса III было особенно подходящим для экспрессии рРНК, поскольку эти короткие некодирующие транскрипты имеют четко определенные концы и все необходимые элементы для транскрипции, за исключением 1+ нуклеотида, содержатся в области промотора, расположенной выше. Однако, поскольку обычно используемому промотору U6 для инициации транскрипции требуется гуанозиновый нуклеотид, то использование промотора U6 еще более ограничивает сайты таргетинга на геном перед GN₁₉NGG (Mali et al. (2013) *Science* 339:823-826; Ding et al. (2013) *Cell Stem Cell* 12:393-394). Для осуществления альтернативных методов, таких как *in vitro* транскрипция под действием промоторов T7, T3 или SP6 также требуется присутствие иницирующего(их) гуанозинового(ых) нуклеотида(ов) (Adhya et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:147-151; Melton et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:7035-7056; Pleiss et al. (1998) *RNA* 4:1313-1317).

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к модификации системы CRISPR/cas9 для нацеливания на онкогенную мутацию или гены-супрессоры опухолей, где в указанной системе для экспрессии руководящих РНК (рРНК или оцрРНК) используется промотор H1 (см. WO2015/19561, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). Такая модифицированная система CRISPR/cas9 в комбинации с рекомбинантным вирусом, упаковывающим аденоассоциированный вирус, может точно нацеливаться на онкогенные мутации при раке или облегчать репарацию дефектного гена-супрессора опухоли с большей эффективностью, безопасностью и точностью. Кроме того, эта модификация обеспечивает компактную систему CRISPR/cas9, которая позволяет осуществлять нацеливание на онкогены с более высоким разрешением, чем CRISPR, TALEN или методы с использованием «цинковых пальцев».

Таким образом, в одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к компетентному по репликации аденовирусу (Ad),

который содержит все транс-элементы, необходимые для репликации и упаковки партнеров рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV). Эта система из двух вирусов позволяет осуществлять репликации обоих вирусов в тандеме, и, тем самым, облегчает локальную репликацию rAAV на участках введения *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта система содержит мутацию в гене Ad E1B для частичного ограничения роста раковых клеток и, таким образом, будет способствовать опухолеспецифической репликации rAAV, снабженного CRISPR, специфичным к гену-драйверу, или другими генетическими элементами, сконструированными для ингибирования пролиферации раковых клеток.

До настоящего времени не сообщалось о каком-либо применении двойной системы Ad-AAV. Новизна этой системы заключается в том, что терапевтические rAAV, которые, обычно являются нереплицирующимися, могут быть сделаны компетентными по репликации.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к композициям, которые могут быть нацелены на функциональные мутации, которые, как известно, вносят свой вклад в рост раковых клеток многих типов. Многие из онкогенных мутаций, обнаруженных в наиболее распространенных видах рака, носят рецидивирующий характер, то есть, точно такая же мутация возникает с высокой частотой при раке данного типа. В настоящее время, в попытках нацеливания на рецидивирующие онкогенные мутации обычно используют низкомолекулярные ингибиторы или стратегию для достижения искусственной летальности в результате повреждения ДНК. Так, например, наиболее распространенный онкоген KRAS не является мишенью для успешного таргетинга и остается «не поддающимся действию лекарственного средства». Такие композиции содержат рРНК, которые направляют эффективное опосредуемое нуклеазой (то есть, cas9) расщепление нескольких наиболее часто встречающихся мутантных сайтов. Следует отметить, что эти композиции, содержащие рРНК, являются в высокой степени специфичными к мутантным аллелям, а поэтому они оказывают незначительное влияние на клетки, имеющие аллели дикого типа.

I. Экспрессия руководящих РНК CRISPR с использованием промотора H1.

A. Композиции

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрываются способы профилактики, ингибирования или лечения рака с использованием композиции, содержащей модифицированную не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, описанную ранее в заявке W02015/195621 (которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). Такая модификация включает использование определенных рРНК, которые нацелены на онкогенные мутации, такие как, но не ограничиваемые ими, KRAS, PIK3CA или IDH1, или мутации в генах-супрессорах опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такая композиция включает (а) не встречающуюся в природе нуклеазную систему (например, CRISPR-cas9), содержащую один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке индивидуума, и где молекула ДНК кодирует один или более генных продуктов, экспрессирующихся в клетке; и ii) регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок cas9), где компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (например, Ad-rAAVpack), одновременно или совместно вводят с аденоассоциированным вирусом, содержащим нуклеазную систему то есть, систему упаковки из двух вирусов). В некоторых вариантах осуществления изобретения, частица одного аденоассоциированного вируса (AAV) может быть использована без упаковывающего

аденовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденоассоциированный вирус (AAV) может содержать человеческий аденоассоциированный вирус любых 11 серотипов (например, серотипов 1-11). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус (AAV) может содержать человеческий аденовирус любого из 51 серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус для упаковки *in vivo* rAAV (то есть, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус) содержит по меньшей мере одну делецию в аденовирусном гене. В некоторых вариантах осуществления изобретения, упаковывающий аденовирус выбран из аденовируса серотипа 2, аденовируса серотипа 5 или аденовируса серотипа 35. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, представляет собой аденовирус серотипа 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусный ген выбран из E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 или L5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусным геном является E3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта система инактивирует один или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну генную мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор включает: а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную на геном, в противоположном направлении. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок cas9 был оптимизирован по кононам для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор функционально присоединен по меньшей мере к одной, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген или ген-супрессор опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является

онкоген, содержащий по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген, выбранный из группы, состоящей из Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, АКТ, с-мус, β -катенина, PDGF, С-МЕТ, PI3K-110a, CDK4, циклина B1, циклина D1, гена рецептора эстрогена, гена рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолога 1 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолога 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолога 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антигена PyV МТ и Т-антигена SV40. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является ген-драйвер рака, выбранный из группы, состоящей из EP300, FBXW7, GATA1, GATA2, NOTCH1, NOTCH2, EXT1, EXT2, PTCH1, SMO, SPOP, SUFU, APC, AXIN1, CDH1, CTNNB1, EP300, FAM123B, GNAS, HNF1A, NF2, PRKAR1A, RNF43, SOX9, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATRX, CREBBP, DNMT1, DNMT3A, EP300, EZH2, H3F3A, HIST1H3B, IDH1, IDH2, KDM5C, KDM6A, MEN1, MLL2, MLL3, NCOA3, NCOR1, PAX5, PBRM1, SETD2, SETBP1, SKP2, SMARCA4, SMARCB1, SPOP, TET2, WT1, AR, BCOR, CREBBP, DAXX, DICER1, GATA3, IKZF1, KLF4, LMO1, PHOX2B, PHF6, PRDM1, RUNX1, SBDS, SF3B1, SRSF2, U2AF1, ABL1, BCL2, CARD11, CASP8, CCND1, CDC73, CDK4, CDKN2A, CDKN2C, CYLD, DAXX, FUBP1, MDM2, MDM4, MED12, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NFE2L2, NPM1, PPM1D, PPP2R1A, RB1, TNFAIP3, TRAF7, TP53, ALK, B2M, BRAF, CBL, CEBPA, CSF1R, CIC, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, NRAS, NF1, PDGFRA, PTPN11, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, VHL, AKT1, ALK, B2M, CBL, CEBPA, CSF1R, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLCN, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, GPC3, KIT, MET, NKX21, PRKAR1A, PIK3CA, PIK3R1, PDGFRA, PTEN, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, STK11, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WAS, CRLF2, FGFR2, FGFR3, FLT3, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, MPL, SOCS1, VHL, B2M, CEBPA, ERK1, GNA11, GNAQ, MAP2K4, MAP3K1, NKX21, TNFAIP3, TSHR, WAS, ACVR1B, BMPR1A, FOXL2, GATA1, GATA2, GNAS, EP300, MED12, SMAD2, SMAD4, ATM, BAP1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1,

BUB1B, CHEK2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBS1, PALB2, PMS1, PMS2, RECQL4, STAG2, TP53, WRN, XPA и XPC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, выбранный из KRAS, PIK3CA или IDH1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является KRAS. В некоторых вариантах осуществления изобретения, KRAS содержит мутацию, выбранную из G13D, G12C или G12D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является PIK3CA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, PIK3CA содержит мутацию, выбранную из E345K, D549N или H1047R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью является онкоген, который представляет собой IDH1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IDH1 содержит мутацию R132H. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность рРНК выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-10 или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, система упаковки из двух вирусов позволяет терапевтическому rAAV итеративно реплицироваться *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, система упаковки из двух вирусов содержит аденовирус 5, обозначаемый Ad-rAAVpack, где вместо гена Ad E3 присутствуют гены *per* и *cap*, происходящие от AAV дикого типа. Обычно Ad E3 функционирует так, что это позволяет вирусу «ускользнуть» от «иммунного надзора» у хозяина, но он не является необходимым ни для литической инфекции, ни для упаковки AAV.

Поскольку кластер гер-сар только на ~1 т.п.о. превышает ген E3, то общий размер Ad-rAAVpack в достаточной степени соответствует опубликованной емкости для упаковки Ad. Ad-rAAVpack имеет все транс-элементы, необходимые для репликации и упаковки партнера rAAV (например, rAAV-TSG или rAAV-онко-CRISPR). Совместное инфицирование тканей-мишеней Ad-rAAVpack и терапевтическим rAAV позволяет rAAV реплицироваться *in vivo*, что может способствовать повышению эффективности доставки трансгена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрываются профилактика, ингибирование или лечение рака с использованием не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или более векторов, включающих: а) промотор H1, функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК системы CRISPR-Cas (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке, и где молекула ДНК кодирует один или более генных продуктов, экспрессирующихся в клетке; и б) регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей белок cas9, где компоненты (а) и (б) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (например, Ad-rAAVpack), одновременно или совместно вводят с аденоассоциированным вирусом, содержащим систему CRISPR-Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрывается не встречающаяся в природе система CRISPR-Cas, содержащая один или более векторов, включающих: а) промотор H1, функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК системы CRISPR-Cas (рРНК), где рРНК гибридизуется с

последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и где молекула ДНК кодирует один или более генных продуктов, экспрессирующихся в эукариотической клетке; и b) регуляторный элемент, действующий в эукариотической клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей белок cas9 типа II, где компоненты (a) и (b) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (например, Ad-rAAVpack), одновременно или совместно вводят с аденоассоциированным вирусом, содержащим систему CRISPR-Cas. В одном аспекте изобретения, последовательностью-мишенью может быть последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, N₂₀NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность GN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность CN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность TN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN₁₉NGG или GN₁₉NGG. В другом аспекте изобретения, белок Cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке. В другом аспекте изобретения, белок Cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в эукариотической клетке. В другом аспекте изобретения, эукариотической клеткой является клетка млекопитающего или человека. В другом аспекте изобретения, экспрессия одного или более генных продуктов является пониженной.

В некоторых вариантах осуществления изобретения также раскрывается не встречающаяся в природе система CRISPR-Cas,

содержащая вектор, включающий двунаправленный промотор H1, где указанный двунаправленный промотор H1 содержит: а) регуляторные элементы, обеспечивающие транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК системы CRISPR-Cas (pРНК) в одном направлении, где pРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и где молекула ДНК кодирует один или более генов, экспрессирующихся в эукариотической клетке; и б) регуляторные элементы, обеспечивающие транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9 типа II в противоположном направлении, где pРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (например, Ad-rAAVpack), одновременно или совместно вводят с аденоассоциированным вирусом, содержащим систему CRISPR-Cas. В одном аспекте изобретения, последовательность-мишенью может быть последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, N₂₀NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность GN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность CN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность TN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN₁₉NGG или GN₁₉NGG. В другом аспекте изобретения, белок Cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке. В другом аспекте изобретения, белок Cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в эукариотической клетке. В другом аспекте изобретения, эукариотической клеткой является клетка млекопитающего или человека. В другом аспекте

изобретения, экспрессия одного или более генных продуктов является пониженной.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, комплекс CRISPR содержит одну или более последовательностей локализации в ядре, длина которых является достаточной для инициации аккумуляции комплекса CRISPR в детектируемом количестве в ядре клетки (например, в эукариотической клетке). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что последовательность локализации в ядре не является необходимой для активации комплекса CRISPR в эукариотах, однако, включение таких последовательностей способствует повышению активности такой системы, а в частности, способствует доставке молекул нуклеиновой кислоты в ядро. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ферментом CRISPR является фермент системы CRISPR типа II. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ферментом CRISPR является фермент Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ферментом Cas9 является Cas9 *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* или *S. thermophilus*, и такой фермент может включать мутированный Cas9, происходящий от этих микроорганизмов. Ферментом может быть гомолог или ортолог Cas9.

Используемые здесь «аденовирусы» представляют собой ДНК-вирусы, имеющие геном в 36 т.п.о. Эти человеческие аденовирусы 51 серотипа отличаются от аденовирусов других известных серотипов по их резистентности к нейтрализации антисывороткой. Хотя большинство аденовирусных векторов происходят от серотипов 2 и 5, однако, могут быть также использованы и другие серотипы, такие как серотип 35. Геном аденовируса дикого типа подразделяется на ранние (E1-E4) и поздние (L1-L5) гены. Аденовирусные векторы могут быть получены так, чтобы они были компетентными по репликации или нереплицирующимися. Чужеродные гены могут быть встроены в три области аденовирусного генома (E1, E3 или E4), а также за главным поздним промотором. Способность аденовирусного генома регулировать продуцирование аденовирусов зависит от последовательностей E1.

Примерами белков, участвующих в супрессии опухоли, могут служить ATM (мутированный белок, вызывающий атаксию-

телангиэктазию), ATR (белок, вызывающий атаксию-телангиэктазию и Rad3-родственный белок), EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), ERBB2 (гомолог 2 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ERBB3 (гомолог 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB4 (гомолог 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), например, Notch 1, Notch2, Notch 3 или Notch 4.

Примерами генов-супрессоров опухоли, которые могут быть соответствующим образом отредактированы, являются гены Rb, P53, INK4a, PTEN, LATS, Araf1, каспазы 8, APC, DPC4, KLF6, GSTP1, ELAC2/HPC2, NKX3.1, ATM, CHK2, ATR, BRCA1, BRCA2, MSH2, MSH6, PMS2, Ku70, Ku80, DNA/PK, XRCC4, нейрофиброматоза типа 1, нейрофиброматоза типа 2, аденоматозного полипоза толстой кишки, t-белка-супрессора опухоли Вильмса, белка Patch, STAG2 и FHIT.

Примерами рекомбинантных онкогенов, подходящих для их использования в настоящем изобретении, являются Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, AKT, c-мус, β -катенин, PDGF, C-MET, PI3K-110a, CDK4, циклин B1, циклин D1, ген рецептора эстрогена, ген рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолог 1 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолог 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолог 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антиген PyV MT и T-антиген SV40. Предпочтительными онкогенами являются Her2, C-MET, PI3K-CA и AKT и Her2 (также известные как neu или ErbB2 (гомолог 2 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2)).

Используемый здесь термин «гены-драйверы рака» охватывает гены рака, включая, но не ограничиваясь ими, EP300, FBXW7, GATA1, GATA2, NOTCH1, NOTCH2, EXT1, EXT2, PTCH1, SMO, SPOP, SUFU, APC, AXIN1, CDH1, CTNNB1, EP300, FAM123B, GNAS, HNF1A, NF2, PRKAR1A, RNF43, SOX9, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATRX, CREBBP, DNMT1, DNMT3A, EP300, EZH2, H3F3A, HIST1H3B, IDH1, IDH2, KDM5C, KDM6A, MEN1, MLL2, MLL3, NCOA3, NCOR1, PAX5, PBRM1, SETD2, SETBP1, SKP2, SMARCA4, SMARCB1, SPOP, TET2, WT1, AR, BCOR,

CREBBP, DAXX, DICER1, GATA3, IKZF1, KLF4, LMO1, PHOX2B, PHF6, PRDM1, RUNX1, SBDS, SF3B1, SRSF2, U2AF1, ABL1, BCL2, CARD11, CASP8, CCND1, CDC73, CDK4, CDKN2A, CDKN2C, CYLD, DAXX, FUBP1, MDM2, MDM4, MED12, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NFE2L2, NPM1, PPM1D, PPP2R1A, RB1, TNFAIP3, TRAF7, TP53, ALK, B2M, BRAF, CBL, CEBPA, CSF1R, CIC, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, NRAS, NF1, PDGFRA, PTPN11, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, VHL, AKT1, ALK, B2M, CBL, CEBPA, CSF1R, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLCN, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, GPC3, KIT, MET, NKX21, PRKAR1A, PIK3CA, PIK3R1, PDGFRA, PTEN, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, STK11, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WAS, CRLF2, FGFR2, FGFR3, FLT3, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, MPL, SOCS1, VHL, B2M, CEBPA, ERK1, GNA11, GNAQ, MAP2K4, MAP3K1, NKX21, TNFAIP3, TSHR, WAS, ACVR1B, BMPR1A, FOXL2, GATA1, GATA2, GNAS, EP300, MED12, SMAD2, SMAD4, ATM, BAP1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BUB1B, CHEK2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBS1, PALB2, PMS1, PMS2, RECQL4, STAG2, TP53, WRN, XPA и XPC. См. также исчерпывающий список Vogelstein *et al.* (2013) *Science* 339:1546.

В целом, и во всем описании изобретения, термин «вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Векторами являются, но не ограничиваются ими, молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются одноцепочечными, двухцепочечными или частично двухцепочечными; молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат один или более свободных концов, и в которых отсутствуют свободные концы (например, кольцевые); молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат ДНК, РНК или то и другое, и другие варианты полинуклеотидов, известных специалистам. Одним из типов векторов является «плазмида», которая представляет собой кольцевую двухцепочечную ДНК-петлю, в которую могут быть встроены дополнительные сегменты ДНК, например, стандартными методами молекулярного клонирования. Другим типом вектора является вирусный вектор, где вирусные последовательности ДНК или РНК присутствуют в векторе для упаковки вируса (например,

ретровирусов, дефектных по репликации ретровирусов, аденовирусов, дефектных по репликации аденовирусов и аденоассоциированных вирусов). Вирусные векторы также включают полинуклеотиды, переносимые вирусом для трансфекции в клетку-хозяина.

Некоторые векторы способны автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный ориджин репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, не-эписомные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина после их введения в клетку-хозяина, и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, к которым они функционально присоединены. Такие векторы называются здесь «экспрессионными векторами». Обычные экспрессионные векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто присутствуют в форме плазмид.

Рекомбинантные экспрессионные векторы могут включать нуклеиновую кислоту согласно раскрытому здесь предмету изобретения в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, и это означает, что рекомбинантные экспрессионные векторы включают один или более регуляторных элементов, которые могут быть выбраны исходя из клеток-хозяев, используемых для экспрессии, и которые функционально присоединены к экспрессируемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Термин «функционально присоединенный», если он относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, означает, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность присоединена к регуляторному (ым) элементу (ам) так, чтобы это обеспечивало экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции *in vitro* или в клетке-хозяине, в которую был введен вектор).

Термин «регуляторный элемент» включает промоторы, энхансеры, внутренние сайты связывания с рибосомой (IRES) и другие элементы регуляции экспрессии (например, сигналы

терминации транскрипции, такие как сигналы полиаденилирования и поли-U-последовательности). Такие регуляторные элементы описаны, например, Goeddel (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. Регуляторными элементами являются элементы, которые регулируют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности в клетках-хозяевах многих типов, и которые регулируют экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифические регуляторные последовательности). Тканеспецифический промотор может регулировать экспрессию преимущественно в представляющей интерес ткани, такой как мышца, нейрон, кости, кожа, кровь, специфические органы (например, печень, поджелудочная железа), или в определенных типах клеток (например, в лимфоцитах). Регуляторные элементы могут также регулировать экспрессию в зависимости от времени, например, в зависимости от клеточного цикла или от стадии развития, и такие элементы могут быть, а могут и не быть, тканеспецифическими или клеткоспецифическими.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор включает один или более промоторов Pol III, один или более промоторов Pol II, один или более промоторов Pol I или их комбинации. Примерами промоторов Pol III являются, но не ограничиваются ими, промоторы U6 и H1. Примерами промоторов Pol II являются, но не ограничиваются ими, промотор LTR ретровируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) (например, Boshart et al. (1985) *Cell* 41:521-530), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β -актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотор EF1 α .

Термин «регуляторный элемент» также включает энхансерные элементы, такие как WPRE; энхансеры CMV; сегмент R-U5' в LTR HTLV-I (Takebe et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472); энхансер SV40; и последовательность интрона между экзонами 2 и 3 кроличьего β -глобина (O'Hare et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(3):1527-31). Специалистам в данной области известно, что

метод конструирования экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, желаемый уровень экспрессии и т.п. Вектор может быть введен в клетки-хозяева для продуцирования транскриптов, белков или пептидов, включая гибридные белки или пептиды, кодируемые описанными здесь нуклеиновыми кислотами (например, кластеризованными регулярно перемежающимися короткими палиндромными повторами (CRISPR)), транскрипты, белки, ферменты, их мутантные формы, гибридные белки и т.п. Предпочтительными векторами являются лентивирусы и аденоассоциированные вирусы, и типы таких векторов могут быть также отобраны для нацеливания на клетки конкретных типов.

Термины «полинуклеотид», «нуклеотид», «нуклеотидная последовательность», «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» используются здесь как синонимы. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов или их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут осуществлять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приводятся неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие области гена или генного фрагмента, локусы (локус), определенные (й) в анализе на сцепление, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, короткая интерферирующая РНК (киРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, нуклеиновокислотные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать один или более модифицированных нуклеотидов, таких как метилированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги. Модификации нуклеотидной структуры, если они присутствуют, могут быть внесены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться не-нуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем присоединения к компоненту для мечения.

В аспектах раскрытого здесь предмета изобретения, термины «химерная РНК», «химерная руководящая РНК», «руководящая РНК», «одна руководящая РНК» и «синтетическая руководящая РНК» приводятся здесь как синонимы и означают полинуклеотидную последовательность, содержащую руководящую последовательность. Термин «руководящая последовательность» означает последовательность приблизительно в 20 п.о. в руководящей РНК, которая является специфичной к сайту-мишени и может использоваться здесь как синоним терминов «гид-РНК» или «спейсер».

Используемый здесь термин «дикого типа» известен специалистам и означает типичную форму организма, штамма, гена или их свойства, присущие им в природе, в отличие от мутантных форм или их вариантов.

Используемый здесь термин «вариант» следует понимать как объект, обладающий качествами, которые отличаются от качеств природного объекта.

Термины «не встречающийся в природе» или «сконструированный» используются как синонимы и означают «искусственно созданный». Эти термины, если они относятся к молекулам нуклеиновых кислот или к полипептидам, означают, что молекула нуклеиновой кислоты или полипептид по меньшей мере, по существу, не содержат по меньшей мере одного другого компонента, с которым они связаны и в такой форме существуют в природе.

«Комплементарность» означает способность нуклеиновой кислоты образовывать водородную (ые) связь (и) с другой последовательностью нуклеиновой кислоты либо по традиционному типу Уотсона-Крика, либо по другим нетрадиционным типам. Процент комплементарности означает процент остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи (например, в результате спаривания оснований Уотсона-Крика) со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, где 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10 остатков будут комплементарны на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100%). «Полностью комплементарный» означает, что все смежные остатки последовательности нуклеиновой кислоты будут образовывать водородную связь с тем же числом смежных остатков

во второй последовательности нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин «по существу комплементарный» относится к степени комплементарности, которая составляет по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% по всей области из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов, или означает, что две нуклеиновые кислоты гибридизуются в жестких условиях.

Используемый здесь термин «условия жесткости» гибридизации относятся к условиям, при которых нуклеиновая кислота, обладающая комплементарностью к последовательности-мишени, преимущественно гибридизуется с последовательностью-мишенью, и, по существу, не гибридизуется с последовательностями, не являющимися мишенями. Условия жесткости, по существу, зависят от последовательности и варьируются в зависимости от ряда факторов. Вообще говоря, чем длиннее последовательность, тем выше температура, при которой эта последовательность специфически гибридизуется с ее последовательностью-мишенью. Неограничивающие примеры условий жесткости подробно описаны Tijssen (1993), *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part 1, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay"*, Elsevier, N.Y.

«Гибридизация» означает реакцию, при которой один или более полинуклеотидов взаимодействуют с образованием комплекса, который стабилизируется посредством образования водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков. Водородные связи могут образовываться посредством спаривания оснований Уотсона-Крика, связывания Хугстена или любым другим последовательность-специфическим способом. Комплекс может содержать две цепи, образующие дуплексную структуру, три или более цепей, образующих многоцепочечный комплекс, одну аутогибридирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может представлять собой стадию в более обширном процессе, таком как иницирование ПЦР или расщепление полинуклеотида ферментом. Последовательность, способная гибридизоваться с данной

последовательностью, называется «комплементом» данной последовательности.

Используемый здесь термин «экспрессия» означает процесс, посредством которого полинуклеотид транскрибируется из матричной ДНК (например, в мРНК или в другой РНК-транскрипт), и/или процесс, посредством которого транскрибируемая мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды могут называться общим термином «генный продукт». Если полинуклеотид происходит от геномной ДНК, то экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

Используемые здесь термины «полипептид», «пептид» и «белок» являются синонимами и означают полимеры из аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться не-аминокислотными остатками. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован, например, посредством образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любых других манипуляций, таких как связывание с компонентом для мечения.

Используемый здесь термин «аминокислота» охватывает природные и/или неприродные или синтетические аминокислоты, включая глицин и его D- или L-оптические изомеры, и аминокислотные аналоги и пептидомиметики.

На практике, настоящее изобретение может быть осуществлено, если это не оговорено особо, с применением стандартных методов иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, биологии клетки, геномики и рекомбинантных ДНК, известных специалистам в данной области (Sambrook, Fritsch and Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition; Ausubel et al., eds. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*); MacPherson et al., eds. (1995) *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach); Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney, ed. (1987) *Animal Cell Culture*).

Некоторые аспекты раскрытого здесь предмета изобретения

относятся к векторным системам, содержащим один или более векторов или к самим векторам. Векторы могут быть сконструированы для экспрессии транскриптов CRISPR (например, транскриптов нуклеиновых кислот, белков или ферментов) в прокариотических или эукариотических клетках. Так, например, транскрипты CRISPR могут экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *Escherichia coli*, в клетках насекомых (с использованием бакуловирусных экспрессионных векторов), в дрожжевых клетках или в клетках млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева более подробно обсуждаются в публикации Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. Альтернативно, рекомбинантный экспрессионный вектор может транскрибироваться и транслироваться *in vitro*, например, посредством регуляторных последовательностей промотора T7 и полимеразы T7.

Векторы могут быть введены в прокариоты, где они могут реплицироваться. В некоторых вариантах осуществления изобретения, прокариоты используют для амплификации копий вектора, вводимого в эукариотическую клетку, или промежуточного вектора для продуцирования вектора, вводимого в эукариотическую клетку (например, для амплификации плазмиды, как части системы, упаковывающей вирусный вектор). В некоторых вариантах осуществления изобретения, прокариоты используют для амплификации копий вектора и экспрессии одной или более нуклеиновых кислот, так, чтобы источник одного или более белков был доставлен в клетку-хозяина или организм хозяина. Экспрессию белков в прокариотах чаще всего проводят в *Escherichia coli* с использованием векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, регулирующие экспрессию гибридных или не-гибридных белков.

Гибридные векторы добавляют ряд аминокислот в кодируемые белки, например, у amino-конца рекомбинантного белка. Такие гибридные векторы могут быть использованы в одной или более целях, таких как: (i) повышение уровня экспрессии рекомбинантного белка; (ii) повышение растворимости рекомбинантного белка; и (iii) облегчение очистки

рекомбинантного белка, который действует в качестве лиганда при аффинной очистке. В большинстве случаев, при получении гибридных экспрессионных векторов, сайт протеолитического расщепления вводят на стыке гибридной молекулы рекомбинантного белка для отделения рекомбинантного белка от гибридной молекулы с последующей очисткой гибридного белка. Такими ферментами и их когнатными распознающими последовательностями являются фактор Ха, тромбин и энтерокиназа. Примерами гибридных экспрессионных векторов являются pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) и pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.), которые связывают глутатион-S-трансферазу (GST), белок, связывающийся с мальтозой Е, или белок А, соответственно, с рекомбинантным белком-мишенью.

Примерами подходящих индуцибельных не-гибридных экспрессионных векторов *E. coli* являются pTrc (Amrann et al. (1988) *Gene* 69:301-315) и pET 11d (Studier et al. (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектором является дрожжевой экспрессионный вектор. Примерами векторов для экспрессии в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* являются pYepSec1 (Baldari, et al. (1987) *EMBO J.* 6: 229-234), pMFa (Kuijan and Herskowitz (1982) *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) и picZ (InVitrogen Corp, San Diego, Calif.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор способен инициировать экспрессию одной или более последовательностей в клетках млекопитающих посредством экспрессионного вектора млекопитающих. Примерами экспрессионных векторов млекопитающих являются pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329: 840) и pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187-195). При использовании в клетках млекопитающих, регуляторные функции экспрессионного вектора обычно обеспечиваются одним или более регуляторными элементами. Так, например, обычно используемые промоторы происходят от полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, обезьяньего вируса 40 и других описанных здесь

вирусов и известных вирусов. Другие экспрессионные системы, подходящие для экспрессии в прокариотических и эукариотических клетках, можно найти, например, в главах 16 и 17 руководства Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный экспрессионный вектор млекопитающих способен регулировать экспрессию нуклеиновой кислоты преимущественно в клетках конкретных типов (например, для экспрессии нуклеиновой кислоты используются тканеспецифические регуляторные элементы). Тканеспецифические регуляторные элементы известны специалистам. Неограничивающими примерами подходящих тканеспецифических промоторов являются промотор альбумина (печень-специфический; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277), лимфоид-специфические промоторы (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275), а в частности, промоторы Т-клеточных рецепторов (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8: 729-733) и иммуноглобулины (Baneiji et al. (1983) *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33: 741-748), нейрон-специфические промоторы (например, промотор нейрофибрилл; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477), промоторы, специфичные к поджелудочной железе (Edlund et al. (1985) *Science* 230: 912-916), и промоторы, специфичные к молочной железе (например, промотор молочной сыворотки; патент США No. 4873316 и публикация Европейской заявки No. 264166). Рост-регулируемые промоторы также охватывают, например, промоторы мышинового гена *hox* (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249: 374-379) и промотор α -фетопротеина (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторный элемент функционально присоединяют к одному или более элементам системы CRISPR для инициации экспрессии одного или более элементов системы CRISPR. В основном, CRISPR (кластеризованные регулярно перемежающиеся короткие палиндромные повторы), также известные как SPIDR (прямые повторы,

перемежающиеся спейсерами) принадлежат к семейству ДНК-локусов, которые обычно являются специфичными к бактериям конкретных видов. Локус CRISPR включает отдельный класс перемежающихся коротких последовательных повторов (SSR), которые распознаются в *E. coli* (Ishino et al. (1987) *J. Bacteriol.*, 169:5429-5433; и Nakata et al. (1989) *J. Bacteriol.*, 171:3553-3556), и в ассоциированных с ними генах. Аналогичные перемежающиеся SSR были идентифицированы в *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena*, and *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al. (1993) *Mol. Microbiol.*, 10:1057-1065; Høe et al. (1999) *Emerg. Infect. Dis.*, 5:254-263; Masepohl et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1307:26-30; и Mojica et al. (1995) *Mol. Microbiol.*, 17:85-93). Локусы CRISPR обычно отличаются от других SSR по структуре повторов, которые называются короткими регулярно перемежающимися повторами (SRSR) (Janssen et al. (2002) *OMICS J. Integ. Biol.*, 6:23-33; и Mojica et al. (2000) *Mol. Microbiol.*, 36:244-246). Обычно, повторы представляют собой короткие элементы, присутствующие в кластерах, которые регулярно перемежаются уникальными промежуточными последовательностями, имеющими, в основном, постоянную длину (Mojica et al. (2000) *Mol. Microbiol.*, 36:244-246). Хотя, последовательности повторов являются в высокой степени консервативными между различными штаммами, однако, число перемежающихся повторов и последовательностей спейсерных областей обычно отличается от штамма к штамму (van Embden et al. (2000) *J. Bacteriol.*, 182:2393-2401). Локусы CRISPR были идентифицированы в более, чем 40 прокариотах (например, Jansen et al. (2002) *Mol. Microbiol.*, 43:1565-1575; и Mojica et al. (2005) *J. Mol. Evol.* 60:174-82), включая, но не ограничиваясь ими, *Aeropyrum*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus*, *Archaeoglobus*, *Halocarcula*, *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanopyrus*, *Pyrococcus*, *Picrophilus*, *Thermoplasma*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Aquifex*, *Porphyromonas*, *Chlorobium*, *Thermus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Mycoplasma*, *Fusobacterium*, *Azarcus*, *Chromobacterium*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Desulfovibrio*,

Geobacter, Myrococcus, Campylobacter, Wolinella, Acinetobacter, Erwinia, Escherichia, Legionella, Methylococcus, Pasteurella, Photobacterium, Salmonella, Xanthomonas, Yersinia, Treponema и *Thermotoga*.

В основном, «система CRISPR» является собирательным понятием и означает транскрипты и другие элементы, участвующие в экспрессии или регуляции активности CRISPR-ассоциированных («Cas») генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas, руководящую последовательность (также называемую здесь «спейсером» применительно к эндогенной системе CRISPR) или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более элементов системы CRISPR происходят от системы CRISPR типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более элементов системы CRISPR происходят от конкретного микроорганизма, содержащего эндогенную систему CRISPR, такого как *Streptococcus pyogenes*. В общих чертах, система CRISPR характеризуется наличием элементов, которые стимулируют образование комплекса CRISPR в сайте последовательности-мишени (также называемом протоспейсером применительно к эндогенной системе CRISPR).

В случае образования комплекса CRISPR, «последовательность-мишень» называется последовательностью, в которой руководящая последовательность была сконструирована для сообщения комплементарности, где гибридизация между последовательностью-мишенью и руководящей последовательностью стимулирует образование комплекса CRISPR. Полная комплементарность не является обязательной, при условии, что она будет достаточной для инициации гибридизации и образования комплекса CRISPR. Последовательность-мишень может содержать любой полинуклеотид, такой как полинуклеотиды ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень локализована в ядре или в цитоплазме клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень может присутствовать в органелле эукариотической клетки, например, в митохондриях или хлоропластах. Последовательность

или матрица, которые могут быть использованы для рекомбинации в локусе-мишени, включающем последовательности-мишени, называются «редактирующей матрицей» или «редактирующим полинуклеотидом» или «редактирующей последовательностью». В аспектах раскрытого здесь предмета изобретения, экзогенный матричный полинуклеотид может называться редактирующей матрицей. В одном аспекте раскрытого здесь предмета изобретения, рекомбинацией является гомологичная рекомбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор содержит один или более сайтов инсерции, таких как последовательность распознавания рестриктирующей эндонуклеазой (также называемая «клонированием сайтом»). В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более сайтов инсерции (например, приблизительно или более, чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов инсерции) расположены выше и/или ниже одного или более элементов последовательности в одном или более векторах. При использовании множества различных руководящих последовательностей, одна экспрессионная конструкция может быть использована для нацеливания активности CRISPR на множество различных соответствующих последовательностей-мишеней в клетке. Так, например, один вектор может содержать приблизительно или более, чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более руководящих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, может быть получено приблизительно или более, чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более таких векторов, содержащих руководящую последовательность, и эти векторы могут быть, но необязательно, доставлены в клетку.

В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит регуляторный элемент, функционально присоединенный к фермент-кодирующей последовательности, кодирующей фермент CRISPR, такой как белок Cas. Неограничивающими примерами белков Cas являются Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известные как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17,

Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, их гомологи или модифицированные варианты. Эти ферменты являются известными, например, аминокислотную последовательность белка Cas9 *S. pyogenes* можно найти в базе данных SwissProt под регистрационным номером Q99ZW2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный фермент CRISPR, такой как Cas9, обладает ДНК-расщепляющей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ферментом CRISPR является Cas9, который может происходить от *S. pyogenes* или *S. pneumoniae*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент CRISPR регулирует расщепление одной или более цепей в последовательности-мишени, например, в последовательности-мишени и/или в комплементе последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент CRISPR регулирует расщепление одной или обеих цепей приблизительно в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500 или более парах оснований первого или последнего нуклеотида последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор кодирует фермент CRISPR, который, по сравнению с соответствующим ферментом дикого типа, был мутирован так, чтобы мутированный фермент CRISPR не обладал способностью расщеплять одну или обе цепи полинуклеотида-мишени, содержащего последовательность-мишень.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент-кодирующая последовательность, кодирующая фермент CRISPR, была оптимизирована по кодонам для экспрессии в конкретных клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут быть клетками конкретного организма или происходить от конкретного организма, такого как млекопитающее, включая, но не ограничиваясь ими, человека, мышей, крыс, кроликов, собак или приматов, не являющихся человеком. В целом, оптимизация по кодонам означает способ модификации последовательности нуклеиновой кислоты для повышения уровня экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах путем замены по меньшей мере одного кодона (например, приблизительно или более, чем

приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности кодонами, которые чаще встречаются или наиболее часто используются в генах этих клеток-хозяев при сохранении нативной аминокислотной последовательности. У различных видов наблюдаются конкретные сдвиги некоторых кодонов конкретных аминокислот. Смещение кодонов (различия в кодонах между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая, в свою очередь, очевидно, зависит, помимо прочего, от других факторов, таких как свойства транслируемых кодонов и доступности конкретных молекул транспортных РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке, как правило, указывает на кодоны, которые наиболее часто используются в синтезе пептидов. В соответствии с этим, гены могут быть адаптированы для оптимальной экспрессии гена в данном организме на основе оптимизации кодонов. Таблицы используемых кодонов легко доступны, например, они имеются в «Базе данных используемых кодонов», и эти таблицы могут быть адаптированы несколькими способами. См. Nakamura et al. (2000) *Nucl. Acids Res.* 28:292. Также имеются доступные компьютерные алгоритмы оптимизации кодонов определенной последовательности для экспрессии в конкретной клетке-хозяине, такие, как Gene Forge (Aptagen; Jacobus., Pa). В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более кодонов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более или все кодоны) в последовательности, кодирующей фермент CRISPR, соответствуют кодону, наиболее часто используемому для конкретной аминокислоты.

В общих чертах, руководящая последовательность представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, имеющую комплементарность с полинуклеотидной последовательностью-мишенью, достаточную для гибридизации с последовательностью-мишенью и для прямого последовательности-специфического связывания комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, степень комплементарности между руководящей последовательностью и соответствующей последовательностью-мишенью, при оптимальном

выравнивании с помощью подходящего алгоритма выравнивания, составляет приблизительно или более чем приблизительно 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более. Оптимальное выравнивание может быть определено с помощью любого подходящего алгоритма для выравнивания последовательностей, неограничиваемыми примерами которого являются алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы на основе программы преобразования Барроу-Виллера (например, алгоритм выравнивания Барроу-Виллера), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif.), SOAP (имеющийся на сайте soap.genomics.org.cn) и Maq (имеющийся на сайте maq.sourceforge.net). В некоторых вариантах осуществления изобретения, руководящая последовательность имеет длину приблизительно или более, чем приблизительно 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, руководящая последовательность имеет длину менее, чем приблизительно 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или менее нуклеотидов.

Способность руководящей последовательности регулировать последовательность-специфическое связывание комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью может быть оценена с помощью любого подходящего анализа. Так, например, компоненты системы CRISPR, достаточные для образования комплекса CRISPR, включая тестируемую руководящую последовательность, могут быть введены в клетку-хозяина, имеющую соответствующую последовательность-мишень, например, путем трансфекции векторами, кодирующими компоненты последовательности CRISPR, с последующей оценкой предпочтительного расщепления в последовательности-мишени, например, с помощью описанного здесь анализа Surveyor. Аналогичным образом, расщепление полинуклеотидной последовательности-мишени может быть оценено в тест-пробирке путем помещения в нее последовательности-мишени, компонентов комплекса CRISPR, включая тестируемую руководящую последовательность и регуляторную руководящую последовательность, отличающуюся от тестируемой руководящей

последовательности, и сравнения уровня связывания или скорости расщепления в сайте последовательности-мишени посредством реакции взаимодействия тестируемой и контрольной руководящей последовательности. Могут быть проведены и другие анализы, и эти анализы известны специалистам.

Руководящая последовательность может быть выбрана для нацеливания на любую последовательность-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является последовательность в геноме клетки. Репрезентативные последовательности-мишени представляют собой последовательности, которые являются уникальными в геноме-мишени. Руководящая последовательность может быть выбрана для нацеливания на любую последовательность-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является последовательность в геноме клетки. Репрезентативные последовательности-мишени представляют собой последовательности, которые являются уникальными в геноме-мишени. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген (например, имеющий онкогенную мутацию) или ген-супрессор опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, содержащий по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген, выбранный из группы, состоящей из Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, АКТ, с-мус, β -катенина, PDGF, С-МЕТ, PI3K-110a, CDK4, циклина B1, циклина D1, гена рецептора эстрогена, гена рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолога 1 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолога 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолога 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антигена PyV МТ и Т-антигена SV40. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является ген-драйвер рака, выбранный из группы, состоящей из EP300,

FBXW7, GATA1, GATA2, NOTCH1, NOTCH2, EXT1, EXT2, PTCH1, SMO, SPOP, SUFU, APC, AXIN1, CDH1, CTNNB1, EP300, FAM123B, GNAS, HNF1A, NF2, PRKAR1A, RNF43, SOX9, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATRX, CREBBP, DNMT1, DNMT3A, EP300, EZH2, H3F3A, HIST1H3B, IDH1, IDH2, KDM5C, KDM6A, MEN1, MLL2, MLL3, NCOA3, NCOR1, PAX5, PBRM1, SETD2, SETBP1, SKP2, SMARCA4, SMARCB1, SPOP, TET2, WT1, AR, BCOR, CREBBP, DAXX, DICER1, GATA3, IKZF1, KLF4, LMO1, PHOX2B, PHF6, PRDM1, RUNX1, SBDS, SF3B1, SRSF2, U2AF1, ABL1, BCL2, CARD11, CASP8, CCND1, CDC73, CDK4, CDKN2A, CDKN2C, CYLD, DAXX, FUBP1, MDM2, MDM4, MED12, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NFE2L2, NPM1, PPM1D, PPP2R1A, RB1, TNFAIP3, TRAF7, TP53, ALK, B2M, BRAF, CBL, CEBPA, CSF1R, CIC, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, NRAS, NF1, PDGFRA, PTPN11, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, VHL, AKT1, ALK, B2M, CBL, CEBPA, CSF1R, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLCN, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, GPC3, KIT, MET, NKX21, PRKAR1A, PIK3CA, PIK3R1, PDGFRA, PTEN, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, STK11, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WAS, CRLF2, FGFR2, FGFR3, FLT3, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, MPL, SOCS1, VHL, B2M, CEBPA, ERK1, GNA11, GNAQ, MAP2K4, MAP3K1, NKX21, TNFAIP3, TSHR, WAS, ACVR1B, BMPR1A, FOXL2, GATA1, GATA2, GNAS, EP300, MED12, SMAD2, SMAD4, ATM, BAP1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BUB1B, CHEK2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBS1, PALB2, PMS1, PMS2, RECQL4, STAG2, TP53, WRN, XPA и XPC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, выбранный из KRAS, PIK3CA или IDH1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является KRAS. В некоторых вариантах осуществления изобретения, KRAS содержит мутацию, выбранную из G13D, G12C или G12D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является PIK3CA. В некоторых вариантах

осуществления изобретения, РІКЗСА содержит мутацию, выбранную из E345K, D549N или H1047R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген, который представляет собой IDH1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IDH1 содержит мутацию R132H. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность рРНК выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-10 или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень может быть на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% гомологична нуклеотидным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 11-18.

Термин «гомологичный» относится к «% гомологии» и является синонимом используемого здесь термина «% идентичности», который относится к уровню идентичности последовательностей нуклеиновой кислоты после их выравнивания с использованием программы выравнивания последовательностей.

Так, например, используемый здесь термин «80% гомология» является синонимом термина «80% идентичность последовательностей», определенного с помощью конкретного алгоритма и, соответственно, гомолог данной последовательности более, чем на 80% идентичен последовательности по всей длине данной последовательности. Типичные уровни идентичности последовательностей включают, но не ограничиваются ими, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или более идентичность нуклеотидным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 1-18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент CRISPR является частью гибридного белка, содержащего один или

более доменов гетерологичного белка (например, приблизительно или более, чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доменов в дополнение к ферменту CRISPR). Гибридный белок фермента CRISPR может содержать любую дополнительную последовательность белка и необязательно линкерную последовательность между любыми двумя доменами. Примерами белковых доменов, которые могут быть присоединены к ферменту CRISPR, являются, но не ограничиваются ими, эпитопные метки, последовательность репортерных генов и белковые домены, обладающие одной или более из следующих активностей: метилазной активностью, деметилазной активностью, активностью активации транскрипции, активностью репрессии транскрипции, активностью рилизинг-фактора транскрипции, активностью модификации гистонов, активностью расщепления РНК и активностью связывания с нуклеиновой кислотой. Неограничивающими примерами эпитопных меток являются гистидиновые (His) метки, метки V5, метки FLAG, метки гемагглютинаина (HA) гриппа, метки Мус, метки VSV-G и тиоредоксиновые метки (Trx). Примерами репортерных генов являются, но не ограничиваются ими, гены глутатион-S-трансферазы (GST), пероксидазы хрена (ПХ), хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT), бета-галактозидазы, бета-глюкуронидазы, люциферазы, белка, флуоресцирующего в зеленом диапазоне спектра (GFP), HcRed, DsRed, белка, флуоресцирующего в голубом диапазоне спектра (CFP), белка, флуоресцирующего в желтом диапазоне спектра (YFP), и аутофлуоресцентных белков, включая белок, флуоресцирующий в синем диапазоне спектра (BFP). Фермент CRISPR может быть присоединен к последовательности гена, кодирующей белок или фрагмент белка, которые связываются с молекулами ДНК или с другими клеточными молекулами, включая, но не ограничиваясь ими, белок, связывающийся с мальтозой (MBP), S-метку, гибриды доменов, связывающихся с ДНК Lex A (DBD), гибриды доменов, связывающихся с ДНК GAL4A, и гибриды белков VP16 вируса простого герпеса (HSV). Дополнительные домены, которые могут образовывать часть гибридного белка, содержащего фермент CRISPR, описаны в патенте США 20110059502, который вводится в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, меченный фермент CRISPR используют для определения локализации последовательности-мишени.

В одном аспекте раскрытого здесь предмета изобретения, репортерный ген, который включает, но не ограничивается ими, ген глутатион-S-трансферазы (GST), пероксидазы хрена (ПХ), хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT), бета-галактозидазы, бета-глюкуронидазы, люциферазы, белка, флуоресцирующего в зеленом диапазоне спектра (GFP), HcRed, DsRed, белка, флуоресцирующего в голубом диапазоне спектра (CFP), белка, флуоресцирующего в желтом диапазоне спектра (YFP), и аутофлуоресцентных белков, включая белок, флуоресцирующий в синем диапазоне спектра (BFP), может быть введен в клетку так, чтобы в ней кодировался генный продукт, который служит в качестве маркера оценки изменения или модификации экспрессии генного продукта. В другом варианте раскрытого здесь предмета изобретения, молекула ДНК, кодирующая генный продукт, может быть введена в клетку посредством вектора. В предпочтительном варианте раскрытого здесь предмета изобретения, генным продуктом является люцифераза. В еще одном варианте раскрытого здесь предмета изобретения, уровень экспрессии генного продукта снижается.

В общих чертах, промоторы согласно вариантам раскрытого здесь предмета изобретения включают: 1) полноразмерный промотор Pol III, который содержит TATA-бокс, проксимальный элемент последовательности (PSE) и дистальный элемент последовательности (DSE); и 2) второй основной промотор Pol III, который содержит PSE и TATA-бокс, присоединенные к 5'-концу DSE в обратной ориентации. TATA-бокс, который назван по его нуклеотидной последовательности, представляет собой основную детерминанту специфичности к Pol III. Он обычно локализуется в положении между нуклеотидами -23 и -30 по отношению к транскрибированной последовательности, и является основной детерминантой начала транскрибированной последовательности. PSE обычно находится между нуклеотидами -45 и -66. DSE усиливает активность основного промотора Pol III. В промоторе HI, отсутствует гэп между PSE и DSE.

Двунаправленные промоторы состоят из: 1) полноразмерного обычного однонаправленного промотора Pol III, который содержит 3 внешних регуляторных элемента: DSE, PSE и TATA-боксы, и 2) второго основного промотора Pol III, который содержит PSE и TATA-боксы, присоединенные к 5'-концу DSE в обратной ориентации. TATA-боксы, который распознается TATA-связывающим белком, играет важную роль в рекрутинге Pol III в область промотора. Связывание TATA-связывающего белка с TATA-боксом стабилизируется посредством взаимодействия SNAPc с PSE. Вместе, эти элементы в положении Pol III скорректированы, так что они могут транскрибировать экспрессированную последовательность. DSE также играет определенную роль в сообщении полной активности промотора Pol III (Murphy et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:3247-3261; Mittal et al. (1996) *Mol. Cell Biol.* 16:1955-1965; Ford и Hernandez (1997) *J. Biol. Chem.*, 272:16048-16055; Ford et al. (1998) *Genes, Dev.*, 12:3528-3540; Hovde et al. (2002) *Genes Dev.* 16:2772-2777). Транскрипция усиливается в 100 раз благодаря взаимодействию факторов транскрипции Oct-1 и/или SBF/Staf с их мотивами в DSE (Kunkel and Nixon (1998) *Nucl. Acid Res.*, 26:1536-1543). Поскольку основные промоторы, ориентированные в прямом и обратном направлении, регулируют транскрипцию последовательностей на противоположных цепях двухцепочечных матричных ДНК, то плюс-цепь основного промотора в обратной ориентации присоединена к 5'-концу минус-цепи DSE. Транскрипты, экспрессируемые под контролем промотора H1, терминируются непрерывной последовательностью 4 или 5 Т.

В промоторе H1, DSE является смежным с PSE и TATA-боксом (Myslinski et al. (2001) *Nucl. Acid Res.* 29:2502-2509). Для минимизации повторения последовательности, этот промотор был сделан двунаправленным путем создания гибридного промотора, в котором транскрипция в обратном направлении регулируется посредством присоединения PSE и TATA-бокса, происходящих от промотора U6. Для облегчения конструирования двунаправленного H1 промотора H1, небольшая спейсерная последовательность может быть также встроена между основным промотором в обратной ориентации и

DSE.

В. Методы

В некоторых вариантах, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способу изменения уровня экспрессии одного или более генных продуктов в эукариотической клетке, где указанная клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более генных продуктов, где указанный способ включает введение в клетку модифицированной не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, описанной ранее в заявке WO2015/195621 (которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). Такая модификация включает использование определенных рРНК, которые нацелены на онкогенные мутации, такие как, но не ограничиваемые ими, KRAS, PIK3CA или IDH1, или мутации в генах-супрессорах опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанный способ включает введение в клетку композиции, содержащей: (а) не встречающуюся в природе нуклеазную систему (например, CRISPR-cas9), содержащую один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке индивидуума, и где молекула ДНК кодирует один или более генных продуктов, экспрессирующихся в клетке; и ii) регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок cas9), где компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (например, Ad-rAAVpack), вводят одновременно или совместно с аденоассоциированным вирусом, содержащим нуклеазную систему (то есть, систему упаковки из двух вирусов). В некоторых вариантах

осуществления изобретения, частица одного аденоассоциированного вируса (AAV) может быть использована без упаковывающего аденовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденоассоциированный вирус (AAV) может содержать человеческий аденоассоциированный вирус любых 11 серотипов (например, серотипов 1-11). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус (AAV) может содержать человеческий аденовирус любого из 51 серотипа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, содержит по меньшей мере одну делецию в аденовирусном гене. В некоторых вариантах осуществления изобретения, упаковывающий аденовирус выбран из аденовируса серотипа 2, аденовируса серотипа 5 или аденовируса серотипа 35. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, представляет собой аденовирус серотипа 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусный ген выбран из E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 или L5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта система инактивирует один или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну генную мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор включает: а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную на геном, в противоположном направлении. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор функционально присоединен по меньшей мере к одной, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген или ген-супрессор опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является

онкоген, содержащий по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген, выбранный из группы, состоящей из Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, АКТ, с-мус, β -катенина, PDGF, С-МЕТ, PI3K-110a, CDK4, циклина B1, циклина D1, гена рецептора эстрогена, гена рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолога 1 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолога 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолога 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антигена PyV МТ и Т-антигена SV40. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является ген-драйвер рака, выбранный из группы, состоящей из EP300, FBXW7, GATA1, GATA2, NOTCH1, NOTCH2, EXT1, EXT2, PTCH1, SMO, SPOP, SUFU, APC, AXIN1, CDH1, CTNNB1, EP300, FAM123B, GNAS, HNF1A, NF2, PRKAR1A, RNF43, SOX9, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATRX, CREBBP, DNMT1, DNMT3A, EP300, EZH2, H3F3A, HIST1H3B, IDH1, IDH2, KDM5C, KDM6A, MEN1, MLL2, MLL3, NCOA3, NCOR1, PAX5, PBRM1, SETD2, SETBP1, SKP2, SMARCA4, SMARCB1, SPOP, TET2, WT1, AR, BCOR, CREBBP, DAXX, DICER1, GATA3, IKZF1, KLF4, LMO1, PHOX2B, PHF6, PRDM1, RUNX1, SBDS, SF3B1, SRSF2, U2AF1, ABL1, BCL2, CARD11, CASP8, CCND1, CDC73, CDK4, CDKN2A, CDKN2C, CYLD, DAXX, FUBP1, MDM2, MDM4, MED12, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NFE2L2, NPM1, PPM1D, PPP2R1A, RB1, TNFAIP3, TRAF7, TP53, ALK, B2M, BRAF, CBL, CEBPA, CSF1R, CIC, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, NRAS, NF1, PDGFRA, PTPN11, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, VHL, AKT1, ALK, B2M, CBL, CEBPA, CSF1R, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLCN, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, GPC3, KIT, MET, NKX21, PRKAR1A, PIK3CA, PIK3R1, PDGFRA, PTEN, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, STK11, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WAS, CRLF2, FGFR2, FGFR3, FLT3, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, MPL, SOCS1, VHL, B2M, CEBPA, ERK1, GNA11, GNAQ, MAP2K4, MAP3K1, NKX21, TNFAIP3, TSHR, WAS, ACVR1B, BMPR1A, FOXL2, GATA1, GATA2, GNAS, EP300, MED12, SMAD2, SMAD4, ATM, BAP1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1,

BUB1B, CHEK2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBS1, PALB2, PMS1, PMS2, RECQL4, STAG2, TP53, WRN, XPA и XPC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, выбранный из KRAS, PIK3CA или IDH1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является KRAS. В некоторых вариантах осуществления изобретения, KRAS содержит мутацию, выбранную из G13D, G12C или G12D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является PIK3CA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, PIK3CA содержит мутацию, выбранную из E345K, D549N или H1047R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью является онкоген, который представляет собой IDH1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IDH1 содержит мутацию R132H. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность рРНК выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-10 или их комбинаций.

В некоторых вариантах, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способу изменения уровня экспрессии одного или более генных продуктов в клетке, где указанная клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более генных продуктов, где указанный способ включает введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или более векторов, включающих: а) промотор H1, функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК системы CRISPR-Cas (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК и б)

регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей белок cas9, где компоненты (a) и (b) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов.

В некоторых вариантах, раскрытый здесь предмет изобретения также относится к способу изменения уровня экспрессии одного или более генных продуктов в эукариотической клетке, где указанная клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более генных продуктов, где указанный способ включает введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или более векторов, включающих: а) промотор H1, функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК системы CRISPR-Cas (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) регуляторный элемент, действующий в эукариотической клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей белок cas9 типа II, где компоненты (a) и (b) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов. В одном аспекте изобретения, последовательность-мишенью может быть последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, N₂₀NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью включает нуклеотидную последовательность AN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью включает нуклеотидную последовательность GN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью включает нуклеотидную последовательность CN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью включает нуклеотидную последовательность TN₁₉NGG. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность $AN_{19}NGG$ или $GN_{19}NGG$. В другом аспекте изобретения, белок Cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке. В другом аспекте изобретения, белок Cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в эукариотической клетке. В другом аспекте изобретения, эукариотической клеткой является клетка млекопитающего или человека. В другом аспекте изобретения, экспрессия одного или более генных продуктов является пониженной.

Раскрытый здесь предмет изобретения также относится к способу изменения уровня экспрессии одного или более генных продуктов в эукариотической клетке, где указанная клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более генных продуктов, где указанный способ включает введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или более векторов, включающих двунаправленный промотор H1, где указанный двунаправленный промотор H1 содержит: а) регуляторные элементы, обеспечивающие транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК системы CRISPR-Cas (рРНК) в одном направлении, где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК и б) регуляторные элементы, обеспечивающие транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9 типа II в противоположном направлении, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов. В одном аспекте изобретения, последовательностью-мишенью может быть последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, $N_{20}NGG$. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность $AN_{19}NGG$. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность $GN_{19}NGG$. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность $CN_{19}NGG$. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность $TN_{19}NGG$. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность $AN_{19}NGG$ или $GN_{19}NGG$. В другом аспекте изобретения, белок Cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке. В другом аспекте изобретения, белок Cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в эукариотической клетке. В другом аспекте изобретения, эукариотической клеткой является клетка млекопитающего или человека. В другом аспекте изобретения, экспрессия одного или более генных продуктов является пониженной.

В некоторых аспектах, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам, включающим доставку одного или более полинуклеотидов, таких как один или более описанных здесь векторов, один или более их транскриптов и/или один или более белков, транскрибируемых из этих векторов, в клетку-хозяина. В некоторых аспектах, раскрытый здесь предмет изобретения также относится к клеткам, полученным такими методами, и к организмам (таким как животные, растения или грибы), включающим такие клетки или полученным из таких клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фермент CRISPR в комбинации (и, необязательно в комплексе) с руководящей последовательностью вводят в клетку. Для введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих или в ткани-мишени могут быть применены стандартные вирусные и не-вирусные методы переноса генов. Такие методы могут быть применены для введения нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты системы CRISPR, в клеточную культуру или в организм хозяина. Невирусные системы доставки вектора включают ДНК-плазмиды, РНК (например, описанный здесь транскрипт вектора), «оголенную» нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома. Вирусные системы доставки вектора включают ДНК-вирус и РНК-вирус, которые имеют либо эписомные, либо интегрированные геномы после их доставки в клетку. Обзор процедур генной терапии можно найти в публикациях Anderson (1992) *Science* 256:808-813; Nabel and Felgner (1993) *TIBTECH* 11:211-217; Mitani and Caskey (1993)

TIBTECH 11:162-166; Dillon (1993) TIBTECH 11:167-175; Miller (1992) *Nature* 357:455-460; Van Brunt (1998) *Biotechnology* 6(10): 1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36; Kremer and Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1):31-44; Haddada et al. (1995) *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Doerfler and Bohm (eds); и Yu et al. (1994) *Gene Therapy* 1:13-26.

Методы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают липофекцию, нуклеофекцию, микроинъекцию, биобаллистические методы, применение виросом, липосом, иммунолипосом, поликатионов или конъюгатов липид:нуклеиновая кислота, оголенной ДНК и искусственных вирионов, и усиленное агентами поглощение ДНК. Липофекция описана в патентах США NN. 5049386, 4946787 и 4897355, а реагенты для липофекции являются коммерчески доступными (например, ТрансфектамTM и ЛипофектинTM). Катионные и нейтральные липиды, подходящие для эффективной липофекции полинуклеотидов, распознаваемых рецепторами, включают липиды, описанные Felgner в WO 91/17424, WO 91/16024. Доставка может быть осуществлена в клетки (например, путем введения *in vitro* или *ex vivo*) или в ткани-мишени (например, путем введения *in vivo*).

Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включающих липосомы для доставки, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известно специалистам (например, Crystal (1995) *Science* 270:404-410; Blaese et al. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297; Behr et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389; Remy et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654; Gao et al. (1995) *Gene Therapy* 2:710-722; Ahmad et al. (1992) *Cancer Res.* 52:4817-4820; патенты США NN. 4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028 и 4946787).

Использование систем на основе РНК- или ДНК-вирусов для доставки нуклеиновых кислот имеет то преимущество, что оно осуществляется посредством высокоэффективных методов доставки вируса в конкретные клетки организма и переноса вирусной полезной нагрузки в ядро. Вирусные векторы могут быть введены

непосредственно пациентам (*in vivo*), либо они могут быть использованы для обработки клеток *in vitro*, а модифицированные клетки могут быть, но необязательно, введены пациентам (например, *ex vivo*). Обычные вирусные системы могут включать ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные векторы, а также векторы на основе аденоассоциированного вируса и вируса простого герпеса для переноса генов. Интеграция в геном хозяина может быть осуществлена методами переноса генов с помощью ретровирусов, лентивирусов и аденоассоциированных вирусов, и такая интеграция, в большинстве случаев, приводит к длительной экспрессии встроенного трансгена. Кроме того, высокоэффективная трансдукция наблюдалась в клетках и тканях-мишенях многих типов.

Тропизм ретровируса может быть изменен путем включения чужеродных оболочечных белков, что будет приводить к расширению потенциальной популяции клеток-мишеней. Лентивирусными векторами являются ретровирусные векторы, способные трансдуцироваться в не-делящиеся клетки или инфицировать эти клетки, и эти векторы обычно продуцируют высокие титры вирусов. Поэтому, отбор ретровирусной системы доставки генов будет зависеть от ткани-мишени. Ретровирусные векторы состоят из цис-действующих длинных концевых повторов с упаковывающей емкостью до 6-10 т.п.о. чужеродной последовательности. Минимальные цис-действующие LTR является достаточными для репликации и упаковки векторов, которые затем используются для интеграции терапевтического гена, в клетку-мишень так, чтобы это приводило к перманентной экспрессии трансгена. Широко используемыми ретровирусными векторами являются векторы на основе вируса мышинного лейкоза (MuLV), вируса лейкоза гиббонов (GALV), обезьяньего вируса иммунодефицита (SIV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и их комбинации (см., Buchscher et al. (1992) *J. Virol.* 66:2731-2739; Johann et al. (1992) *J. Virol.* 66:1635-1640; Sommerfelt et al. (1990) *J. Virol.* 176:58-59; Wilson et al. (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller et al. (1991) *J. Virol.* 65:2220-2224; PCT/US94/05700). В тех случаях, когда предпочтительной является транзистная экспрессия, могут быть использованы аденовирусные системы. Аденовирусные векторы способны осуществлять очень

высокоэффективную трансдукцию в клетки многих типов и не требуют деления клеток. С использованием таких векторов могут быть достигнуты высокие титры и высокие уровни экспрессии. Этот вектор может быть получен в больших количествах в относительно простой системе. Векторы на основе аденоассоциированных вирусов («AAV») могут быть также использованы для трансдукции клеток нуклеиновыми кислотами-мишенями, например, для *in vitro* продуцирования нуклеиновых кислот и пептидов и для генотерапии *in vivo* и *ex vivo* (см., например, West et al. (1987) *Virology* 160:38-47; патент США No. 4797368; WO 93/24641; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351). Конструирование рекомбинантных AAV-векторов описано в различных публикациях, включая патент США No. 5173414; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260; Tratschin et al. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat and Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6466-6470; и Samulski et al. (1989) *J. Virol.* 63:03822-3828.

Упаковывающие клетки обычно используются для образования вирусных частиц, способных инфицировать клетку-хозяина. Такими клетками являются клетки 293, которые упаковывают аденовирус, и клетки ψ 2 или PA317, которые упаковывают ретровирус. Вирусные векторы, используемые в генотерапии, обычно получают путем продуцирования клеточной линии, которая упаковывает вектор на основе нуклеиновой кислоты в вирусную частицу. Векторы обычно содержат минимальные вирусные последовательности, необходимые для упаковки и последующей интеграции в хозяина, а другие вирусные последовательности заменяют экспрессионным кластером для экспрессии полинуклеотида(ов). Недостающие вирусные функции обычно сообщаются *in trans* упаковывающей клеточной линией. Так, например, AAV-векторы, используемые в генотерапии, обычно содержат только последовательности ITR, происходящие от генома AAV, необходимого для упаковки, экспрессии трансгена и его интеграции в геном хозяина. Вирусная ДНК упаковывается в клеточную линию, содержащую хелперную плазмиду, кодирующую другие гены AAV, а именно, *g_{er}* и *g_{cap}*, но не содержащую

последовательностей ITR. Клеточная линия может быть инфицирована аденовирусом в качестве вируса-помощника, а клетки 293 и их производные содержат аденовирусную ДНК, а поэтому, этим клеткам для упаковки AAV не требуется аденовирусная инфекция. Вирус-помощник способствует репликации вектора AAV и экспрессии генов AAV из хелперной плазмиды. Хелперная плазида не упаковывается в значительных количествах, что обусловлено отсутствием последовательностей ITR. Контаминация аденовирусом может быть снижена например, путем термообработки, в результате чего аденовирус становится более чувствительным, чем AAV. Дополнительные методы доставки нуклеиновых кислот в клетки известны специалистам. См., например, US20030087817, который вводится в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетку-хозяина транзигентно или нетранзигентно трансфецируют одним или более описанными здесь векторами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетку трансфецируют так, как это обычно происходит в природе у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансфецированную клетку берут у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта клетка происходит от клеток, взятых у индивидуума, таких как клеточная линия. Специалистам известно широкое разнообразие клеточных линий для культивирования тканей. Примерами клеточных линий являются, но не ограничиваются ими, C8161, CCRF-CEM, MOLT, mIMCD-3, NHDF, HeLa-S3, Huh1, Huh4, Huh7, HUVEC, HASMC, HEKn, HEKa, MiaPaCell, Panel, PC-3, TF1, CTLL-2, C1R, Rat6, CV1, RPTE, A10, T24, J82, A375, ARH-77, Calu1, SW480, SW620, SKOV3, SK-UT, CaCo2, P388D1, SEM-K2, WENI-231, HB56, TIB55, Jurkat, J45.01, LRMB, Bcl-1, BC-3, IC21, DLD2, Raw264.7, NRK, NRK-52E, MRC5, MEF, Hep G2, HeLa B, HeLa T4, COS, COS-1, COS-6, COS-M6A, эпителиальные клетки почек обезьяны BS-C-1, фибробласты мышинных эмбрионов BALB/3T3, 3T3 Swiss, 3T3-L1, фибробласты плода человека 132-d5; мышинные фибробласты 10.1, клетки 293-T, 3T3, 721, 9L, A2780, A2780ADR, A2780cis, A172, A20, A253, A431, A-549, ALC, B16, B35, BCP-1, BEAS-2B, bEnd.3, BHK-21, BR 293, BxPC3, C3H-10T1/2, C6/36, Cal-27, CHO, CHO-7, CHO-IR, CHO-K1,

CHO-K2, CHO-T, CHO Dhfr -/-, COR-L23, COR-L23/CPR, COR-L23/5010, COR-L23/R23, COS-7, COV-434, CML T1, CMT, CT26, D17, DH82, DU145, DuCaP, EL4, EM2, EM3, EMT6/AR1, EMT6/AR10.0, FM3, H1299, H69, HB54, HB55, HCA2, HEK-293, HeLa, Hepalclc7, HL-60, HMEC, HT-29, Jurkat, клетки JY, клетки K562, клеточные линии Ku812, KCL22, KG1, KYO1, LNCap, Ma-MeI 1-48, MC-38, MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, MDCK II, MDCK II, MOR/0.2R, MONO-MAC 6, MTD-1A, MyEnd, NCI-H69/CPR, NCI-H69/LX10, NCI-H69/LX20, NCI-H69/LX4, NIH-3T3, NALM-1, NW-145, OPCN/OPCT, Peer, PNT-1A/PNT 2, RenCa, RIN-5F, RMA/RMAS, клетки Saos-2, Sf-9, SkBr3, T2, T-47D, T84, клеточная линия THP1, U373, U87, U937, VCaP, клетки Vero, WM39, WT-49, X63, YAC-1, YAR, и их трансгенные варианты. Клеточные линии поставляются от различных источников, известных специалистам (см. например, Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (Manassus, Va.)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетку, трансфицированную одним или более описанными здесь векторами, используют для создания новой клеточной линии, содержащей последовательности, происходящие от одного или более векторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетку, транзитивно трансфицированную компонентами описанной здесь системы CRISPR (например, путем транзитивной трансфекции одним или более векторами или РНК-трансфекции) и модифицированную за счет активности комплекса CRISPR, используют для создания новой клеточной линии, содержащей клетку, имеющую модификацию, но не содержащую любой другой экзогенной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки, транзитивно или нетранзитивно трансфицированные одним или более описанными здесь векторами, или клеточные линии, происходящие от таких клеток, используют для оценки одного или более тестируемых соединений.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более из описанных здесь векторов используют для получения трансгенного животного, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансгенным животным является млекопитающее, такое как мышь, крыса или кролик. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, организмом или индивидуумом является растение. Методы получения трансгенных животных известны специалистам в данной области, и обычно осуществление таких методов начинают с трансфекции клеток, например, как описано в настоящей заявке.

В одном аспекте, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам модификации полинуклеотида-мишени в эукариотической клетке, которые могут быть проведены *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает взятие образца клеток или популяции клеток у человека или животного, не являющегося человеком, и модификацию такой клетки или клеток. Культивирование может быть осуществлено на любой стадии *ex vivo*. Клетка или клетки могут быть даже повторно введены животному, не являющемуся человеком.

В одном аспекте, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам модификации полинуклеотида-мишени в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает инициацию связывания комплекса CRISPR с полинуклеотидом-мишенью для эффективного расщепления полинуклеотида-мишени, и, тем самым, модификацию полинуклеотида-мишени, где указанный комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с руководящей последовательностью, гибридной с последовательностью-мишенью в полинуклеотиде-мишени.

В одном аспекте, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способу модификации экспрессии полинуклеотида в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает инициацию связывания комплекса CRISPR с полинуклеотидом так, чтобы это связывание способствовало повышению или снижению уровня экспрессии полинуклеотида, где указанный комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с руководящей последовательностью, гибридной с последовательностью-мишенью в полинуклеотиде.

В одном аспекте, раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам применения одного или более элементов системы CRISPR. Комплекс CRISPR согласно раскрытому здесь

предмету изобретения представляет собой эффективное средство для модификации полинуклеотида-мишени. CRISPR согласно раскрытому здесь предмету изобретения находит широкое применение, включая модификацию (например, делецию, инсерцию, транслокацию, инактивацию, активацию) полинуклеотида-мишени в клетках многих типов. Комплекс CRISPR, как таковой, согласно раскрытому здесь предмету изобретения имеет широкий спектр применения, например, в генотерапии, в скрининге лекарственных средств, в диагностике заболеваний и в оценке прогноза. Репрезентативный комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с руководящей последовательностью, гибридизованной с последовательностью-мишенью в полинуклеотиде-мишени.

Полинуклеотидом-мишенью комплекса CRISPR может быть любой полинуклеотид, который является эндогенным или экзогенным для эукариотической клетки. Так, например, полинуклеотидом-мишенью может быть полинуклеотид, сохраняющийся в ядре эукариотической клетки. Полинуклеотидом-мишенью может быть последовательность, кодирующая генный продукт (например, белок), или некодирующая последовательность (например, регуляторный полинуклеотид или избыточная ДНК). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что последовательность-мишень должна быть связана с PAM (мотивом, смежным с протоспейсером), то есть, с короткой последовательностью, распознаваемой комплексом CRISPR. Точная последовательность и длина PAM отличаются в зависимости от используемого фермента CRISPR, но PAM обычно имеют последовательность в 2-5 пар оснований, смежных с протоспейсером (то есть, последовательность-мишень). Примеры последовательностей PAM приводятся ниже в разделе «Примеры», и специалист в данной области может самостоятельно определить другие последовательности PAM, подходящие для использования вместе с данным ферментом CRISPR.

Примерами полинуклеотидов-мишеней являются последовательности, сцепленные с путем передачи биохимического сигнала, например, с геном или полинуклеотидом пути передачи биохимического сигнала. Примерами полинуклеотидов-мишеней являются ген или полинуклеотид, ассоциированный с заболеванием.

Термин «ассоциированный с заболеванием» ген или полинуклеотид означает любой ген или полинуклеотид, дающий продукты транскрипции или трансляции на аномальном уровне или в аномальной форме в клетках, происходящих от пораженных заболеванием тканей по сравнению с контрольными тканями или здоровыми клетками. Таким геном может быть ген, который экспрессируется на аномально высоком уровне, и ген, который экспрессируется на аномально низком уровне, где измененный уровень экспрессии коррелирует с возникновением и/или прогрессированием заболевания. Ассоциированный с заболеванием ген также представляет собой ген, имеющий мутацию(и) или генетическую модификацию, которые непосредственно ответственны за развитие заболевания или имеют неравновесное сцепление с геном(ами), который(ые) непосредственно ответствен(ы) за развитие заболевания. Транскрибированные или транслированные продукты могут быть известными или неизвестными и могут присутствовать на нормальном или аномальном уровне.

Варианты раскрытого здесь предмета изобретения относятся к способам и композициям для нокаута генов, амплификации генов и репарации конкретных мутаций, ассоциированных с нестабильностью повторов ДНК и нервными расстройствами (Robert D. Wells, Tetsuo Ashizawa, *Genetic Instabilities and Neurological Diseases, Second Edition, Academic Press, Oct. 13, 2011-Medical*). Было обнаружено, что конкретные варианты повторяющихся тандемных последовательностей ответственны за развитие более, чем двадцати заболеваний у человека (McIvor et al. (2010) *RNA Biol.* 7(5):551-8). Система CRISPR-Cas может быть использована для коррекции этих дефектов геномной нестабильности.

С. Композиции

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтически приемлемым композициям, которые включают систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack), и которые приготовлены вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями. В другом аспекте изобретения, композиции могут быть введены как таковые или в смеси с

фармацевтически приемлемыми носителями, а также они могут быть введены в сочетании с другими противораковыми средствами терапии, такими как химиотерапевтические средства, акцепторные соединения, лучевая терапия, биологическая терапия и т.п. Таким образом, комбинированная терапия включает последовательное, одновременное и отдельное или совместное введение композиции, где терапевтические эффекты от соединений, введенных вначале, полностью не исчезают при введении последующего соединения.

Как подробно описано ниже, фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть специально приготовлены для введения в твердой или жидкой форме, включая формы, адаптированные для: (1) перорального введения, например, увлажняющих средств (водных или безводных растворов или суспензий), таблеток, например, таблеток для трансбуккального введения, подъязычного введения и системного всасывания; болюсов, порошков, гранул, паст для нанесения на язык; (2) парентерального введения, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции, например, в виде стерильного раствора или суспензии, или препарата с пролонгированным высвобождением; (3) местного применения, например, в виде крема, мази или пластыря для регулируемого высвобождения, или спрея для нанесения на кожу; (4) интравагинального или ректального введения, например, в виде pessaries, крема или пены; (5) подъязычного введения; (6) офтальмического введения; (7) трансдермального введения или (8) интраназального введения.

Как указано выше, некоторые варианты композиций, содержащих систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack), могут содержать основную функциональную группу, такую как амино или алкиламино, и, таким образом, способны образовывать фармацевтически приемлемые соли фармацевтически приемлемых кислот. Эти соли могут быть приготовлены *in situ* в носителе для доставки или способом приготовления лекарственных форм или путем отдельного взаимодействия очищенного соединения согласно изобретению в форме свободного основания с подходящей органической или

неорганической кислотой и выделения полученной таким образом соли в процессе последующей очистки. Репрезентативными солями являются гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, фосфат, нитрат, ацетат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактобионат и лаурилсульфонат и т.п. (см., например, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

Фармацевтически приемлемые соли соединений согласно изобретению включают обычные нетоксичные соли или четвертичные аммониевые соли соединений, например, нетоксичных органических или неорганических кислот. Так, например, такими обычными нетоксичными солями являются соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная кислота и т.п.; и соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, пальмитиновая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изотионовая кислота и т.п.

В других случаях, композиции, содержащие систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) согласно изобретению, могут содержать одну или более кислотных функциональных групп, и, таким образом, способны образовывать фармацевтически приемлемые соли фармацевтически приемлемых оснований. Эти соли могут быть приготовлены *in situ* в носителе для доставки или способом приготовления лекарственных форм или путем отдельного взаимодействия очищенного соединения в форме его свободной кислоты с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла с аммиаком или с фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Репрезентативными

солями щелочных или щелочноземельных металлов являются соли лития, натрия, калия, кальция, магния и алюминия и т.п. Репрезентативными органическими аминами, подходящими для образования основно-аддитивных солей, являются этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и т.п. (например, Verge et al., см. выше).

В композициях могут также присутствовать смачивающие агенты, эмульгаторы и лубриканты, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, антиадгезивы, агенты для нанесения покрытий, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

Примерами фармацевтически приемлемых антиоксидантов являются: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) агенты, образующие хелатные комплексы с металлом, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Композициями, содержащими препараты на основе системы упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack), являются композиции, подходящие для внутриопухолевого, перорального, интраназального, местного (включая трансбуккальное и подъязычное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Композиции могут быть соответствующим образом приготовлены в виде унифицированной лекарственной формы и могут быть приготовлены любыми способами, хорошо известными специалистам-фармацевтам. Количество активного ингредиента, который может быть объединен с материалом-носителем для получения одной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от хозяина, подвергаемого лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который может быть объединен с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, обычно представляет собой

количество соединения, которое дает терапевтический эффект.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, состав композиций, содержащих систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack), может включать и другие носители, обеспечивающие большую стабильность, различные антиадгезивные свойства *in vivo*, доставку в конкретный участок или любые другие желаемые свойства, обеспечивающие более эффективную доставку системы упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) индивидууму или в нужный участок организма индивидуума, такие как, но не ограничивающиеся ими, липосомы, микросферы, наносферы, наночастицы, пузырьки, агенты, образующие мицеллы, например, желчные кислоты и полимерные носители, например, сложные полиэфиры и полиангидриды. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вышеупомянутый препарат позволяет перорально вводить биологически доступное соединение согласно изобретению.

Жидкие лекарственные препараты системы упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо активного ингредиента, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, масло из семян хлопчатника, арахисовое масло, кукурузное масло, масло из пророщенных семян, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, и их смеси.

Кроме инертных разбавителей, композиции для перорального введения могут также включать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

Суспензии, кроме активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар, трагакант и их смеси.

Препараты для перорального введения могут быть приготовлены в виде капсул, каши, драже, таблеток, пастилок (полученных с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и аравийской или трагакантовой камеди), порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или безводной жидкости, или в виде эмульсии «масло в воде» или «вода в масле», или в виде эликсира или сиропа, или в виде лекарственных лепешек (полученных с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и аравийская камедь) и/или в виде жидкости для полоскания рта и т.п., где каждый из этих препаратов содержит предварительно определенное количество активного ингредиента. Композиции, содержащие систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) согласно изобретению, могут быть также введены в виде болюса, лекарственной каши или пасты.

В твердых лекарственных формах (например, в капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках, гранулах и т.п.), активный ингредиент смешивают с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дифосфат кальция, и/или с любыми из нижеследующих компонентов, таких как:

- (1) наполнители или увеличители объема, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота;
- (2) связующие вещества, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь;
- (3) увлажнители, такие как глицерин;
- (4) дезинтегрирующие агенты, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия;
- (5) агенты, замедляющие растворение, такие как парафин;
- (6) ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония;
- (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт, моностеарат глицерина и

неионные поверхностно-активные вещества; (8) абсорбенты, такие как каолиновая и бентонитовая глина; (9) лубриканты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красители. В случае использования капсул, таблеток и драже, композиции могут также содержать забуферивающие агенты. Твердые композиции аналогичного типа могут быть также использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах, полученных с использованием таких наполнителей, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Таблетка может быть изготовлена прессованием или формованием, необязательно, с одним или более вспомогательными ингредиентами. Спрессованные таблетки могут быть получены с использованием связующего вещества (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), лубриканта, инертного разбавителя, консерванта, дезинтегрирующего агента (например, натрий-содержащего гликолята крахмала или поперечно-сшитой натрий-карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активного вещества или диспергирующего агента. Сформованные таблетки могут быть изготовлены формованием смеси порошкообразного соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем, в соответствующей машине.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут иметь, но необязательно, насечки, либо они могут иметь покрытия и оболочки, такие как энтеросолубильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные специалистам-фармацевтам. Они могут быть также приготовлены для замедленного или регулируемого высвобождения активного ингредиента с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных соотношениях для обеспечения желательного профиля высвобождения, и других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Могут быть также приготовлены композиции для быстрого высвобождения, например, в лиофилизированной форме. Они могут быть стерилизованы, например, фильтрованием через фильтр, задерживающий бактерии, или путем

включения стерилизующих агентов в виде стерильных твердых композиций, которые можно растворить в стерильной воде или в какой-либо другой стерильной среде для инъекций непосредственно перед употреблением. Эти композиции могут также, но необязательно, содержать контрастные агенты и могут представлять собой композиции с пролонгированным высвобождением, но необязательно, только активного(ых) ингредиента(ов), или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта. Примерами заливочных композиций, которые могут быть использованы, являются полимерные вещества и воски. Активный ингредиент может быть также приготовлен в форме микрокапсул, если это необходимо, вместе с одним или более из описанных выше наполнителей.

Композиции для ректального или вагинального введения могут быть приготовлены в виде суппозиториев, которые могут быть получены путем смешивания одного или более соединений согласно изобретению с одним или более подходящими не вызывающими раздражение наполнителями или носителями, содержащими, например, масло какао, полиэтиленгликоль, воск для суппозиториев или салицилат, и которые являются твердыми при комнатной температуре, но жидкими при температуре тела и, следовательно, будут расплавляться в прямой кишке или во влагалище и высвобождать активное соединение.

Препаратами, подходящими для вагинального введения, также являются pessaries, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или аэрозольные препараты, содержащие носители, известные специалистам в данной области.

Лекарственными формами для местного или трансдермального введения композиций, содержащих систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) согласно изобретению, являются порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, если это необходимо.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, помимо активного

соединения согласно изобретению, наполнители, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмалы, трагакантовые камеди, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка, или их смеси.

Порошки и аэрозоли могут содержать наполнители, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок или смеси этих веществ. Спреи могут дополнительно содержать специальные пропелленты, такие как фторхлоруглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, обеспечивающее регулируемую доставку в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или диспергирования соединения в соответствующей среде. Усилители абсорбции могут быть также использованы для ускорения прохождения соединения через кожу. Скорость такого потока можно регулировать либо с помощью скорость-ограничивающей мембраны, либо путем диспергирования соединения в полимерной матрице или геле.

Офтальмические препараты, глазные мази, порошки, растворы и т.п. также рассматриваются как препараты, входящие в объем настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения или внутриопухолевого введения, могут включать стерильные изотонические водные или безводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии или стерильные порошки, которые могут быть разведены в стерильных инъеклируемых растворах или дисперсиях непосредственно перед использованием, и которые могут содержать сахара, спирты, антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые придают композиции изотоничность с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие агенты или загустители.

Примерами подходящих водных и безводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях согласно изобретению, являются вода, этанол, полиолы (такие как глицерин,

пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, с использованием материалов для нанесения покрытий, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и с использованием поверхностно-активных веществ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные выше фармацевтические композиции могут быть объединены с другими фармакологически активными соединениями («вторыми активными агентами»), известными специалистам в данной области, в соответствии с описанными здесь методами получения композиций. Вторые активные агенты могут представлять собой крупные молекулы (например, белки) или небольшие молекулы (например, синтетические неорганические металлоорганические или органические молекулы). В одном варианте осуществления изобретения, вторые активные агенты могут способствовать лечению рака по отдельности или синергически.

Так, например, химиотерапевтическими средствами являются противораковые средства. Термин «химиотерапевтическое средство» включает, но не ограничивается ими, агенты на основе платины, такие как карбоплатин и цисплатин; алкилирующие агенты на основе азотного аналога горчичного газа; нитрозомочевинные алкилирующие агенты, такие как кармустин (BCNU) и другие алкилирующие агенты; антиметаболиты, такие как метотрексат; антиметаболиты на основе пуриновых аналогов; антиметаболиты на основе пиримидиновых аналогов, такие как фторурацил (5-FU) и гемцитабин; гормональные противоопухолевые средства, такие как гозерелин, лейпролид и тамоксифен; природные противоопухолевые средства, такие как таксаны (например, доцетаксел и паклитаксел), альдеслейкин, интерлейкин-2, этопозид (VP-16), интерферон-альфа и третиноин (ATRA); природные противоопухолевые антибиотики, такие как блеомицин, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин и митомицин; и винкаалкалоидные природные противоопухолевые средства, такие как винбластин и винкрестин.

Кроме того, нижеследующие препараты могут быть также

использованы в комбинации с противоопухолевыми средствами, даже если они сами не являются противоопухолевыми средствами, такими как дактиномицин; даунорубицин-НС1; доцетаксел; доксорубицин-НС1; эпоэтин-альфа; этопозид (VP-16); натрий-содержащий ганцикловир; сульфат гентамицина; интерферон альфа; ацетат лейпролида; меперидин-НС1; метадон-НС1; ранитидин-НС1; сульфат винбластина; и зидовудин (AZT). Так, например, фторурацил недавно был приготовлен в комбинации с эпинефрином и бычьим коллагеном с образованием особенно эффективной комбинации.

Кроме того, могут быть также использованы нижеследующие аминокислоты, пептиды, полипептиды, белки, полисахариды и другие крупные молекулы: интерлейкины 1-18, включая мутанты и аналоги; интерфероны или цитокины, такие как интерфероны α , β и γ ; гормоны, такие как лютеинизирующий релизинг-гормон (LHRH) и его аналоги; релизинг-фактор гонадотропина (GnRH); факторы роста, такие как трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста нервных клеток (NGF), релизинг-фактор гормона роста (GHRF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор, гомологичный фактору роста фибробластов (FGFHF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF); фактор некроза опухоли- α и β (TNF- α и β); фактор, ингибирующий инвазию-2 (IIF-2); белки морфогенеза кости 1-7 (BMP 1-7); соматостатин; тимозин- α -1; γ -глобулин; супероксид-дисмутаза (SOD); факторы комплемента; факторы анти-ангиогенеза; антигенные соединения; и пролекарства.

Химиотерапевтическими средствами для использования в сочетании с описанными здесь композициями и способами лечения, являются, но не ограничиваются ими, алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодоп, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (а в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан);

бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его адозелезиновые, карзелезиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВ1-ТМ1); элейтеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотные аналоги горчичного газа, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый аналог горчичного газа; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, а в частности, калихеамицин-гамма 1 и калихеамицин-омега 1); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин, а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромофоры хромопротеинового энединового антибиотика, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицин, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромидин, пуромицин, хеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; антиадренергические средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан;

средства, компенсирующие потерю фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид алдофосфамида; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; теноазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел и доксетаксел; хлорамбуцил; гемцитабин; б-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДФМО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; и их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные.

В другом варианте осуществления изобретения, композиция согласно изобретению может включать другие биологически активные вещества, включая терапевтические лекарственные средства или пролекарства, например, другие химиотерапевтические средства, акцепторные соединения, антибиотики, противовирусные средства, противогрибковые средства, противовоспалительные средства, сосудосуживающие средства и антикоагулянты, антигены, подходящие для приготовления противораковых вакцин, или соответствующие пролекарства.

Примерами акцепторных соединений являются, но не

ограничиваются ими, тиол-содержащие соединения, такие как глутатион, тиомочевина и цистеин; спирты, такие как маннит, замещенные фенолы; хиноны, замещенные фенолы, ариламины и нитросоединения.

Могут быть использованы различные формы химиотерапевтических агентов и/или других биологически активных агентов. Такими агентами являются, но не ограничиваются ими, агенты в форме незаряженных молекул, молекулярных комплексов, солей, простых эфиров, сложных эфиров, амидов и т.п., которые являются биологически активными.

II. Способы лечения рака

Раскрытый здесь предмет изобретения относится к способам профилактики, ингибирования или лечения рака у индивидуума (например, человека), нуждающегося в этом. Эти способы включают стадии: (a) получения не встречающейся в природе нуклеазной системы (например, CRISPR-cas9), содержащей один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке (например, в раковой клетке) индивидуума, и где молекула ДНК кодирует один или более генных продуктов, экспрессирующихся в клетке; и ii) регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, cas9), где компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии или к инактивации одного или более генных продуктов; и (b) введения индивидууму терапевтически эффективного количества этой системы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (например, Ad-rAAVpack), одновременно или совместно вводят с аденоассоциированным вирусом, содержащим нуклеазную систему то

есть, систему упаковки из двух вирусов). В некоторых вариантах осуществления изобретения, систему упаковывают в частицу одного аденоассоциированного вируса (AAV) без использования упаковывающего аденовируса. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденоассоциированный вирус (AAV) может содержать человеческий аденоассоциированный вирус любых 11 серотипов (например, серотипов 1-11). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус (AAV), содержит по меньшей мере одну делецию в аденовирусном гене. В некоторых вариантах осуществления изобретения, упаковывающий аденовирус выбран из аденовируса серотипа 2, аденовируса серотипа 5 или аденовируса серотипа 35. В некоторых вариантах осуществления изобретения, упаковывающий вирус представляет собой аденовирус серотипа 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусный ген выбран из E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 или L5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусным геном является E3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта система инактивирует один или более генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну генную мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор включает: а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную на геном, в противоположном направлении. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор функционально присоединен по меньшей мере к одной, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти рРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген или ген-супрессор опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является

онкоген, содержащий по меньшей мере одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является онкоген, выбранный из группы, состоящей из Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, АКТ, с-мус, β -катенина, PDGF, С-МЕТ, PI3K-110a, CDK4, циклина B1, циклина D1, гена рецептора эстрогена, гена рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолога 1 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолога 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолога 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антигена PyV МТ и Т-антигена SV40. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательностью-мишенью является ген-драйвер рака, выбранный из группы, состоящей из EP300, FBXW7, GATA1, GATA2, NOTCH1, NOTCH2, EXT1, EXT2, PTCH1, SMO, SPOP, SUFU, APC, AXIN1, CDH1, CTNNB1, EP300, FAM123B, GNAS, HNF1A, NF2, PRKAR1A, RNF43, SOX9, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATRX, CREBBP, DNMT1, DNMT3A, EP300, EZH2, H3F3A, HIST1H3B, IDH1, IDH2, KDM5C, KDM6A, MEN1, MLL2, MLL3, NCOA3, NCOR1, PAX5, PBRM1, SETD2, SETBP1, SKP2, SMARCA4, SMARCB1, SPOP, TET2, WT1, AR, BCOR, CREBBP, DAXX, DICER1, GATA3, IKZF1, KLF4, LMO1, PHOX2B, PHF6, PRDM1, RUNX1, SBDS, SF3B1, SRSF2, U2AF1, ABL1, BCL2, CARD11, CASP8, CCND1, CDC73, CDK4, CDKN2A, CDKN2C, CYLD, DAXX, FUBP1, MDM2, MDM4, MED12, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NFE2L2, NPM1, PPM1D, PPP2R1A, RB1, TNFAIP3, TRAF7, TP53, ALK, B2M, BRAF, CBL, CEBPA, CSF1R, CIC, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, NRAS, NF1, PDGFRA, PTPN11, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, VHL, AKT1, ALK, B2M, CBL, CEBPA, CSF1R, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLCN, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, GPC3, KIT, MET, NKX21, PRKAR1A, PIK3CA, PIK3R1, PDGFRA, PTEN, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, STK11, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WAS, CRLF2, FGFR2, FGFR3, FLT3, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, MPL, SOCS1, VHL, B2M, CEBPA, ERK1, GNA11, GNAQ, MAP2K4, MAP3K1, NKX21, TNFAIP3, TSHR, WAS, ACVR1B, BMPR1A, FOXL2, GATA1, GATA2, GNAS, EP300, MED12, SMAD2, SMAD4, ATM, BAP1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1,

BUB1B, CHEK2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBS1, PALB2, PMS1, PMS2, RECQL4, STAG2, TP53, WRN, XPA и XPC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, выбранный из KRAS, PIK3CA или IDH1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является KRAS. В некоторых вариантах осуществления изобретения, KRAS содержит мутацию, выбранную из G13D, G12C или G12D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является PIK3CA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, PIK3CA содержит мутацию, выбранную из E345K, D549N или H1047R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность-мишенью является онкоген, который представляет собой IDH1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IDH1 содержит мутацию R132H. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность рРНК выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-10 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазную систему вводят путем системного введения. В некоторых вариантах осуществления, системное введение выбрано из группы, состоящей из перорального, внутривенного, интрадермального, внутрибрюшинного, подкожного и внутримышечного введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеазную систему вводят вовнутрь опухоли или возле опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в способе по п. 1, индивидууму вводят по меньшей мере одно дополнительное противораковое средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения, противораковое средство выбрано из

группы, состоящей из паклитаксела, цисплатина, топотекана, гемцитабина, блеомицина, этопозиды, карбоплатина, доцетаксела, доксорубицина, топотекана, циклофосамида, трабектедина, олапариба, тамоксифена, летрозолы и бевацизумаба. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму проводят по меньшей мере одну дополнительную противораковую терапию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, противораковой терапией является лучевая терапия, химиотерапия или хирургическая операция. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак выбран из группы, состоящей из рака головного мозга, рака желудочно-кишечного, рака ротовой полости, рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, рака печени, рака горла, рака желудка и рака почек. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак представляет собой рак головного мозга. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения, млекопитающим является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пролиферация клеток у индивидуума ингибируется или снижается. В некоторых вариантах осуществления изобретения, злокачественная опухоль у индивидуума ингибируется или уменьшается. В некоторых вариантах осуществления изобретения, некроз опухоли у индивидуума усиливается или повышается.

Способность E1b-дефицитных аденовирусов продуктивно инфицировать и лизировать опухолевые клетки была описана в литературе. Хотя механизмы, лежащие в основе тропизма раковых клеток, оказались более сложными, чем это сначала предполагалось, однако, онколитический аденовирус, разработанный Онух (известный как Онух-015), хорошо зарекомендовал себя в ряде клинических испытаний, и в настоящее время имеется в продаже в Китае как Онкорин. В отличие от ONYX-015, Ad-rAAVpack был сконструирован с «тонкой» мутацией E1B, которая предотвращает вирус от подавления врожденного иммунного ответа на инфекцию, но при этом, сохраняет способность регулировать экспорт вирусной

РНК в цитоплазму. Этот ответ, опосредованный интерферонами, обычно теряется во многих раковых клетках.

Применение Ad-rAAVpack для лечения рака представляет несколько стратегических вариантов. Партнер rAAV может содержать компактный супрессор опухоли или иммунный стимулятор, подобный интерферону. Альтернативно, партнер rAAV может быть снабжен системой CRISPR-cas9 (например, системой AAV-H1-CRISPR). рРНК, включенные в такой rAAV, могут быть запрограммированы на специфическое нацеливание на онкогенную мутацию или на облегчение репарации дефектного гена-супрессора опухоли.

Предсказанным преимуществом системы из двух вирусов для противораковой терапии по сравнению только с одним rAAV, является степень и продолжительность целевой доставки гена/нацеленной генетической модификации. Введение одной дозы терапевтического rAAV, вероятно, может способствовать нацеливанию на множество клеток в доступной опухоли. В том случае, когда модифицированной таким образом популяции клеток не достаточно для существенного влияния на течение заболевания, Ad-rAAVpack может быть объединен с rAAV. При сравнении репликативного потенциала самой опухоли, система упаковки из двух вирусов может предоставлять уникальную возможность для нацеливания на большую часть раковых клеток в течение более длительного периода времени. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что эта онколитическая терапия на основе двух вирусов может работать так, как это показано на фиг. 3.

Для нацеливания на онкогенные мутации, партнер rAAV может быть сконструирован для высокоспецифической инактивации рецидивирующих онкогенных мутаций. Настоящее изобретение относится к панели рРНК, которые могут селективно разрушать ассоциированные с раком онкогенные формы KRAS, PIK3CA и IDH1. В целом, эти специфические мутации в KRAS и PIK3CA встречаются в большинстве раковых опухолей в легких и во всем желудочно-кишечном тракте. Мутация IDH1 R132 была обнаружена приблизительно в 30% глиом. Эти опухоли головного мозга являются особенно резистентными ко всем стандартным терапиям. Каждая из

этих рРНК главным образом нацелена на мутантный аллель, но не оказывает побочного действия на остальные аллеля дикого типа.

Термин «введение» означает доставку фармацевтического средства или композиции индивидууму, и включает, но не ограничивается ими, введение медицинским персоналом и прием самим пациентом.

Используемый здесь термин «расстройство» в общих чертах означает любое состояние, которое необходимо устранить путем лечения соединением, направленным против одной из идентифицированных мишеней или путей, включая любое заболевание, расстройство или состояние, которое может быть устранено путем введения эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, направленных против одной из идентифицированных мишеней или путей.

Используемый здесь термин «рак» означает аномальный рост клеток, которые имеют тенденцию к неконтролируемой пролиферации, а в некоторых случаях, к метастазированию (распространению). Типами рака являются, но не ограничиваются ими, солидные опухоли (например, такие как опухоли мочевого пузыря, толстой кишки, головного мозга, молочной железы, эндометрия, сердца, почек, легких, матки, лимфатической ткани (лимфома), яичников, поджелудочной железы или другого эндокринного органа (щитовидной железы), предстательной железы, кожи (меланома или базально-клеточный рак) или гематологические опухоли (такие как лейкозы и лимфомы) на любой стадии заболевания с метастазами или без метастазов.

Дополнительными неограничивающими примерами рака являются гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокарцинома, рак заднего прохода, рак аппендикса, астроцитомы, атипичная тератоидная/рабдоидная опухоль, базально-клеточная карцинома, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости (остеосаркома и злокачественная фиброзная гистиоцитома), глиома ствола головного мозга, опухоли головного мозга, опухоли головного и спинного мозга, рак молочной железы, опухоли бронхов, лимфома Беркитта, рак шейки матки, хронический

лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, рак толстой кишки, рак прямой и ободочной кишки, краниофарингиома, кожная Т-клеточная лимфома, эмбриональные опухоли, рак эндометрия, эпендимобластома, эпендимома, рак пищевода, наследственная саркома Юинга, рак глаза, ретинобластома, рак желчного пузыря, рак желудка (кишечника), карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST), стромально-клеточная опухоль желудочно-кишечного тракта, опухоли зародышевых клеток, глиома, ретикулоэндотелиоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак (рак печени), лимфома Ходжкина, гипофарингеальный рак, внутриглазная меланома, опухоли островковых клеток (эндокринной поджелудочной железы), саркома Капоши, рак почки, гистиоцитоз клеток Лангерганса, рак гортани, лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, ретикулоэндотелиоз, рак печени, рак легких, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, лимфома Беркитта, кожная Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, лимфома, макроглобулинемия Вальденстрема, медуллобластома, медуллоэпителиома, меланома, мезотелиома, рак ротовой полости, хронический миелогенный лейкоз, миелоидный лейкоз, множественная миелома, рак носоглотки, нейробластома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легких, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома кости, рак яичников, эпителиальный рак яичников, опухоль зародышевых клеток яичника, скрытая низкоккачественная опухоль яичника, рак поджелудочной железы, папилломатоз, рак парашитовидной железы, рак полового члена, рак плотки, шишковидные паренхимные опухоли промежуточной дифференцировки, пинеобластома и супратенториальные первичные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, новообразования клеток плазмы /множественная миелома, плевропульмональная бластома, первичная лимфома центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечноклеточный рак (рак почек), ретинобластома, рабдомиосаркома, рак слюнных желез, саркома,

наследственная саркома Юинга, саркома Капоши, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легких, рак тонкого кишечника, саркома мягких тканей, плоскоклеточная карцинома, рак желудка (кишечника), супратенториальные первичные нейроэктодермальные опухоли, Т-клеточная лимфома, рак яичка, рак горла, тимомы и карцинома тимуса, рак щитовидной железы, рак уретры, рак матки, саркома матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемия Вальденстрема, опухоль Вильмса.

Используемый здесь термин «лечение» может включать обратное развитие, облегчение, ингибирование прогрессирования заболевания, или профилактику или снижение вероятности развития заболевания, расстройства или состояния, к которому применяется этот термин, или одного или более симптомов или манифестаций такого заболевания, расстройства или состояния (например, рака). В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение приводит к снижению числа раковых клеток. Так, например, лечение может уменьшить число раковых клеток по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 66%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более по сравнению с раковыми клетками у индивидуума перед прохождением лечения или у индивидуума, который не проходил такое лечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение приводит к полному ингибированию раковых клеток у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, перед введением индивидууму, систему упаковывают в частицу одного аденоассоциированного вируса (AAV). Лечение, введение или терапия могут быть проведены последовательно или с перерывами. Последовательное лечение, введение или терапия означают по меньшей мере ежедневное лечение в течение одного или более дней без перерыва. Прерывистое лечение или введение, или лечение или введение с перерывами означает лечение, которое проводится не последовательно, а циклически. Лечение в соответствии с описанными здесь способами может приводить к полному устранению или выздоровлению от заболевания, расстройства или состояния, или к частичному ослаблению одного или более симптомов данного

заболевания, расстройства или состояния, и может быть временным или постоянным. Термин «лечение» также охватывает профилактику, терапию и наблюдение после лечения.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» означает количество агента, которое является достаточным для достижения благоприятных или желаемых результатов. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от одного или более факторов: от конкретного индивидуума и патологического состояния, подвергаемого лечению, массы и возраста индивидуума, тяжести патологического состояния, способа введения и т.п., которые могут быть легко определены специалистом в данной области. Этот термин также означает дозу, которая позволит осуществлять визуальное детектирование любым описанным здесь методом визуализации. Конкретная доза может варьироваться в зависимости от одного или более факторов: от конкретно выбранного агента, схемы введения доз, независимо от того, вводятся ли они в комбинации с другими соединениями или нет, времени введения, визуализированной ткани и физической системы доставки. Как будет понятно специалистам в данной области, эффективное количество агента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как желаемая биологическая конечная точка, агент для доставки, состав фармацевтической композиции, тип ткани-мишени или клетки-мишени и т.п. Более конкретно, термин «эффективное количество» означает количество, достаточное для достижения желаемого эффекта, например, для уменьшения или снижения тяжести, продолжительности, прогрессирования или отсрочки начала развития заболевания, расстройства или состояния, или одного или более их симптомов; предупреждения прогрессирования заболевания, расстройства или состояния и стимуляции обратного развития заболевания, расстройства или состояния; предотвращения рецидивов, развития, возникновения или прогрессирования симптомов, ассоциированных с заболеванием, расстройством или состоянием, или усиления или улучшения профилактического (их) или терапевтического (их) эффекта (ов) другого терапии.

Термин «ингибировать» или «ингибирует» относится к

уменьшению, подавлению, ослаблению, снижению, прекращению или стабилизации развития или прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, активности биологического пути или биологической активности, такой как рост солидной злокачественной опухоли, например, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%) или даже на 100% по сравнению с контрольными индивидуумами, не проходящими лечение, а также с контрольными клеткой, биологическим путем или биологической активностью или по сравнению с мишенью, такой как солидная злокачественная опухоль у индивидуума до лечения. Термин «уменьшение» относится к ингибированию, подавлению, уменьшению, ослаблению, прекращению или стабилизации симптома ракового заболевания, расстройства или состояния. Следует отметить, что лечение заболевания, расстройства или состояния не означает, что данное заболевание, расстройство, состояние или ассоциированные с ним симптомы будут полностью устранены, хотя это и не исключается.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый» относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в соответствии с точной клинической оценкой, являются подходящими для использования при контактировании с тканями человека и животных и не вызывают чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений с точки зрения соотношения польза/риск.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такие как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент или вещество, инкапсулирующее растворитель, используемые для переноса или доставки рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или другую часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» с точки зрения его совместимости с другими ингредиентами препарата и отсутствия вреда для пациента. Некоторыми примерами веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, являются: (1) сахара,

такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлоза и ее производные, такие как натрий-содержащая карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразная трагакантовая камедь; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) наполнители, такие как масло какао и воски для суппозитория; (9) масла, такие как арахисовое масло, масло из семян хлопчатника, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) забуферивающие агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновая кислота; (16) апиrogenная вода; (17) изотонический физиологический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH-забуференные растворы; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических препаратах.

Термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к относительно нетоксичным, неорганическим и органическим кислотно-аддитивным солям соединений.

Термины «предотвращать», «предотвращение», «профилактика», «профилактическое лечение» и т.п. относятся к снижению вероятности развития заболевания, расстройства или состояния у индивидуума, который не имеет такого заболевания, расстройства или состояния, но имеет риск их развития или является восприимчивым к развитию такого заболевания, расстройства или состояния.

Термины «индивидуум» и «пациент» используются здесь как синонимы. Индивидуумом, подвергаемым лечению описанными здесь способами в соответствии со многими вариантами осуществления изобретения, предпочтительно является человек, хотя следует отметить, что описанные здесь способы являются эффективными для лечения позвоночных всех видов, которые входят в понятие «индивидуум». В соответствии с этим, термин «индивидуум» может

включать человека, нуждающегося в лечении, например, человека, который подвергается лечению имеющегося у него состояния или заболевания или профилактическому лечению для предупреждения начала развития состояния или заболевания, или животное, используемое в медицинских целях, нуждающееся в ветеринарном лечении, или животное для разведения. Подходящими животными являются млекопитающие, включая, но не ограничиваясь ими, приматов, например, человека, обезьян, человекообразных обезьян и т.п.; крупный рогатый скот, например, коров, быков и т.п., животных семейства овец, например, овец и т.п., животных семейства козлиных, например, коз и т.п.; свиней, например, поросят, кабанов и т.п.; животных семейства лошадиных, например, лошадей, ослов, зебр и т.п.; животных семейства кошачьих, включая диких и домашних кошек; животных семейства собачьих, включая собак; животных семейства заячьих, включая кроликов, зайцев и т.п.; и грызунов, включая мышей, крыс и т.п. Животное может быть трансгенным животным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является человек, включая, но не ограничиваясь ими, плод, новорожденных, детей, несовершеннолетних и взрослых пациентов. Кроме того, «индивидуум» может включать пациента, страдающего состоянием или заболеванием, или пациента с подозрением на такое заболевание или состояние.

Термин «индивидуум, нуждающийся в этом» означает, что такой индивидуум нуждается в терапии или лечении.

Термины «системное введение», «вводимый системно», «периферическое введение» и «вводимый периферически» означает введение соединения, лекарственного средства или другого вещества не непосредственно в центральную нервную систему, а в другие органы пациента так, чтобы эти лекарственные средства подвергались там метаболизму и другим подобным процессам, например, подкожное введение.

Термин «терапевтическое средство» или «фармацевтическое средство» означает средство, способное давать желаемый биологический эффект у хозяина. Химиотерапевтические и генотоксические агенты являются примерами терапевтических

средств, которые, в основном, известны как химические вещества по своей природе, в отличие от биологических средств, или дают терапевтический эффект по конкретному механизму их действия, соответственно. Примерами терапевтических средств биологического происхождения являются факторы роста, гормоны и цитокины. Специалистам известно множество терапевтических агентов, которые могут быть идентифицированы по их эффектам. Некоторые терапевтические средства способны регулировать пролиферацию и дифференцировку клеток. Примерами являются химиотерапевтические нуклеотиды, лекарственные препараты, гормоны, неспецифические белки (например, не антитела), олигонуклеотиды (например, антисмысловые олигонуклеотиды, которые связываются с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени (например, с последовательностью мРНК)), пептиды и пептидомиметики.

Термин «терапевтический эффект» означает локальный или системный эффект у животных, а в частности у млекопитающих, а более конкретно у человека, вызываемый фармакологически активным веществом.

Используемые здесь термины «терапевтически эффективное количество» и «эффективное количество» означают количество соединения, вещества или композиции, содержащей соединение согласно изобретению, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического эффекта по меньшей мере в субпопуляции клеток животных в приемлемом соотношении польза/риск при их применении в любом консервативном лечении.

Термины «опухоль», «солидные злокачественные опухоли» или «новообразования» относятся к поражениям, которые образуются в результате аномального или нерегулируемого роста клеток. Предпочтительно, опухоль является злокачественной, например, раковой опухолью.

Описанные выше композиции, наборы и способы детектирования, диагностики и прогнозирования могут быть применены для облегчения выбора соответствующей схемы лечения и для выявления индивидуумов, у которых может наблюдаться благоприятный эффект при более агрессивной терапии.

Как было отмечено выше, способами лечения рака являются

хирургическая операция, иммунотерапия, химиотерапия, лучевая терапия, комбинация химиотерапии и лучевой терапии или биологическая терапия. Химиотерапевтическими средствами, которые используются для лечения карцином, являются, но не ограничиваются ими, доксорубицин (адриамицин), цисплатин, ифосфамид и кортикостероиды (преднизон). В большинстве случаев, эти средства, вводимые в комбинации, дают лучший эффект. Комбинациями, используемыми для лечения рака, являются комбинации цисплатина, доксорубицина, этопозиды и циклофосфамида, а также комбинация цисплатина, доксорубицина, циклофосфамида и винкристина.

Таким образом, описанные выше способы находят особое применение при выборе соответствующего лечения для больных раком на ранней стадии. Большинство людей, у которых рак был диагностирован на ранней стадии, после хирургического вмешательства и/или лучевой терапии живут долго без какой-либо дальнейшей адъювантной терапии. Тем не менее, значительная часть этих людей страдают от рецидивов заболевания или умирают, а поэтому в соответствии с клиническими рекомендациями, некоторые или все пациенты с раком на ранней стадии должны проходить адъювантную терапию (например, химиотерапию). Способы согласно изобретению, позволяют идентифицировать такую группу индивидуумов с высоким риском и плохим прогнозом рака на ранней стадии, а поэтому эти способы могут быть применены для определения благоприятного эффекта после длительной и/или более агрессивной терапии и тщательного мониторинга после лечения. Так, например, пациенты, страдающие раком на ранней стадии и имеющие плохой прогноз, как было определено описанными здесь способами, могут быть отобраны для проведения более агрессивной адъювантной терапии, такой как химиотерапия, после хирургической операции и/или лучевой терапии. В конкретных вариантах осуществления изобретения, способы согласно изобретению могут быть применены в сочетании со стандартными процедурами и способами лечения, что позволяет врачам принимать более обоснованные решения в отношении лечения рака.

Термин «ответ на лечение рака» или «исход противораковой

терапии» при гиперпролиферативном расстройстве (например, при раке) относится к любой реакции на лечение рака, а предпочтительно, к изменению массы и/или объема опухоли после начала неoadъювантной или адъювантной химиотерапии. Ответ при гиперпролиферативном расстройстве может быть оценен на эффективность, например, в случае неoadъювантной или адъювантной терапии, где размер опухоли после системной терапии можно сравнить с начальным размером и с размерами, измеренными с помощью КТ, ПЭТ, маммографии, УЗИ или пальпации. Реакция может быть также оценена путем измерения штангенциркулем или гистологического исследования опухоли после биопсии или хирургической резекции солидных опухолей. Ответы могут быть зарегистрированы как количественное изменение, такое как процентное изменение объема опухоли, или качественное изменение, такое как «полный ответ на лечение заболевания» (pCR), «полная клиническая ремиссия» (cCR), «частичная клиническая ремиссия» (cPR), «клинически стабильное заболевание» (cSD), «клинически прогрессирующее заболевание» (cPD) или другие качественные критерии. Оценка ответа при гиперпролиферативных расстройствах может быть сделана в ранние сроки после начала неoadъювантной или адъювантной терапии, например, через несколько часов, дней, недель или, предпочтительно, через несколько месяцев. Типичная конечная точка для оценки отклика является оценка, сделанная после окончания неoadъювантной химиотерапии или после хирургического удаления остаточных опухолевых клеток и/или ложа опухоли. Такую оценку обычно проводят через три месяца после начала неoadъювантной терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клиническая эффективность описанных здесь способов терапевтического лечения может быть определена путем измерения степени клинически благоприятного эффекта (CBR). Степень клинически благоприятного эффекта оценивают путем определения суммы процентов пациентов, у которых наблюдалась полная ремиссия (CR), числа пациентов с частичной ремиссией (PR) и числа пациентов, имеющих стабильное заболевание (SD) по меньшей мере через 6 месяцев после окончания терапии. Сокращенно, эту формулу можно записать как: $CBR=CR+PR+SD$ в

течение 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения, CBR для конкретной схемы противораковой терапии составляет по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или более.

Дополнительными критериями оценки ответа на противораковую терапию рака являются «продолжительность жизни», которая включает все нижеследующие параметры: продолжительность жизни до летального исхода, также известная как общая продолжительность жизни (где такой летальный исход может случиться независимо от опухоли или от причины, связанной с опухолью); «продолжительность жизни без рецидивов» (где термин «рецидив» включает как локализованные, так и отдаленные метастазы); продолжительность жизни без метастазов; продолжительность жизни без заболевания (где термин «заболевание» включает рак и ассоциированные с ним заболевания). Указанная продолжительность жизни может быть вычислена по сравнению с определенной начальной точкой (например, время диагностики или начала лечения) и конечной точкой (например, смерти, рецидивов или метастазов). Кроме того, критерии эффективности лечения могут быть расширены, и включают ответ на химиотерапию, вероятность выживания, вероятность появления метастазов в течение заданного периода времени и вероятность рецидива опухоли. Так, например, для определения соответствующих пороговых величин для групп индивидуумов может быть проведена конкретная схема противораковой терапии, и исход лечения может быть скоррелирован по числу копий, уровню экспрессии, уровню активности и т.д. одного или более описанных здесь SNP или инсерций-делаций (INDEL), которые были определены перед проведением любой противораковой терапии. Оценка исхода лечения может представлять собой ответ на лечение заболевания после неoadъювантной терапии. Альтернативно, может быть проведен мониторинг параметров исхода лечения, таких как общая продолжительность жизни и продолжительность жизни без заболевания в течение определенного периода времени у индивидуумов после проведения противораковой терапии, для которых такие величины измерений являются известными. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

каждому индивидууму вводят одинаковые дозы противораковых терапевтических средств. В родственных вариантах осуществления изобретения, вводимые дозы являются стандартными дозами, известными специалистам по противораковым терапевтическим средствам. Период времени обследования индивидуумов может варьироваться. Так, например, обследование индивидуумов может проводиться по меньшей мере в течение 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 месяцев. Результаты также могут быть оценены с точки зрения «степени риска» (отношение показателей смертности для одной группы пациентов и для другой группы, выражающее вероятность летального исхода в определенный момент времени), «общей продолжительности жизни» (OS) и/или «продолжительности жизни без прогрессирования заболевания». В некоторых вариантах осуществления изобретения, прогноз означает вероятность общей выживаемости в течение 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет или любого другого периода времени. Клиническую значимость, связанную с плохим прогнозом во всех аспектах настоящего изобретения, определяют методами, известными специалистам в данной области. Так, например, такая значимость может быть определена путем вычисления отношения вероятностей. В другом варианте осуществления изобретения, значимость измеряется в процентах. В одном варианте осуществления изобретения, степень значимого риска неблагоприятного исхода определяют как отношение вероятности 0,8 или менее или по меньшей мере приблизительно 1,2, включая, но не ограничиваясь ими: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0 и 40,0. В другом варианте осуществления изобретения, значительное увеличение или снижение риска составляет по меньшей мере приблизительно 20%, включая, но не ограничиваясь ими, приблизительно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%), 97%), 98%, 99%) и более, или значения в любом интервале между ними, в отношении соответствующих критериев (например, точности, чувствительности, специфичности, продолжительности жизни в течение 5 лет, продолжительности жизни в течение 10 лет,

продолжительности жизни без метастазов, прогнозирования стадий заболевания и т.п.). В другом варианте осуществления изобретения, значительное увеличение риска составляет по меньшей мере 50%. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способам принятия решения о лечении ракового пациента, включающим способы оценки прогноза для больного раком в соответствии с различными аспектами и вариантами осуществления изобретения, а затем взвешивания результатов по другим известным факторам клинического и патологического риска, при определении курса лечения для больного раком. Так, например, пациенту с раком, у которого, как показали способы согласно изобретению, имеется повышенный риск неблагоприятного исхода после проведения комбинированной химиотерапии, может быть назначена более агрессивная терапия, включая, но не ограничиваясь ими, лучевую терапию, трансплантацию стволовых клеток периферической крови, трансплантацию костного мозга или новую или экспериментальную терапию, проходящую клиническое исследование. Кроме того, следует отметить, что ответы на противораковую терапию могут быть предсказаны описанными здесь способами в соответствии с критериями повышенной чувствительности и/или специфичности. Так, например, чувствительность и/или специфичность может составлять по меньшей мере 0,80, 0,81, 0,82, 0,83, 0,84, 0,85, 0,86, 0,87, 0,88, 0,89, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99 или более, а также любые значения в интервале между ними или любые комбинации каждого из критериев чувствительности и специфичности.

Термин «сенсibilизировать» относится к модификации раковых клеток или опухолевых клеток, так, чтобы это обеспечивало более эффективное лечение рака, вызываемого этими клетками, с помощью противораковой терапии (например, химиотерапии или лучевой терапии). В некоторых вариантах осуществления изобретения, нормальные клетки не поражаются в такой степени, чтобы это вызывало излишнее поражение нормальных клеток после противораковой терапии (например, химиотерапии или лучевой терапии). Повышенную чувствительность или пониженную чувствительность к терапевтическому лечению определяют методом,

известным специалистам в области проведения конкретных способов лечения, и такие методы описаны ниже, включая, но не ограничиваясь ими, анализы на пролиферацию клеток (Tanigawa N, Kern D H, Kikasa Y, Morton D L, Cancer Res 1982; 42: 2159-2164), анализы на клеточную гибель (Weisenthal L M, Shoemaker R H, Marsden J A, Dill P L, Baker J A, Moran E M, Cancer Res 1984; 94: 161-173; Weisenthal L M, Lippman M E, Cancer Treat Rep 1985; 69: 615-632; Weisenthal L M, In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentyman P R, Weisenthal L M, Veerman A J P, eds. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Langhorne, P A: Harwood Academic Publishers, 1993: 415-432; Weisenthal L M, Contrib Gynecol Obstet 1994; 19: 82-90). Чувствительность или резистентность могут быть также оценены у животного путем оценки уменьшения размера опухоли в течение определенного периода времени, например, в течение 6 месяцев для человека и 4-6 недель для мыши. Композиция или способ способствуют сенсбилизации ответа на терапевтическое лечение, если повышение чувствительности к терапии или снижение резистентности составляет 25% или более, например, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более, или в 2 раза, 3 раза, 4 раза, в 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз или более, по сравнению с чувствительностью к лечению или резистентностью к лечению без введения такой композиции или без применения этого способа. Определение чувствительности или резистентности к терапевтическому лечению, является стандартной процедурой в данной области и входит в компетенцию врача-клинициста. Следует отметить, что любой описанный здесь способ повышения эффективности противораковой терапии может быть в равной степени применен к способам сенсбилизации гиперпролиферативных или каких-либо других раковых клеток (например, резистентных клеток) к противораковой терапии.

Термин «продолжительность жизни» включает все нижеследующие параметры: продолжительность жизни до летального исхода, также известная как общая продолжительность жизни (где такой летальный исход может случиться независимо от опухоли или от причины, связанной с опухолью); «продолжительность жизни без рецидивов»

(где термин «рецидив» включает как локализованные, так и отдаленные метастазы); продолжительность жизни без метастазов; продолжительность жизни без заболевания (где термин «заболевание» включает рак и ассоциированные с ним заболевания). Указанная продолжительность жизни может быть вычислена по сравнению с определенной начальной точкой (например, временем диагностики или начала лечения) и конечной точкой (например, временем смерти, рецидивов или метастазов). Кроме того, критерии эффективности лечения может быть расширены и включают ответ на химиотерапию, вероятность выживания, вероятность появления метастазов в течение заданного периода времени и вероятность рецидива опухоли.

Настоящее изобретение также относится к новым терапевтическим способам профилактики, замедления, снижения тяжести и/или лечения рака, включая лечение раковой опухоли. В одном варианте осуществления изобретения, способ лечения включает введение индивидууму (например, индивидууму, нуждающемуся в этом) эффективного количества системы упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG. Индивидуумом, нуждающимся в этом, может быть, например, индивидуум, у которого была диагностирована опухоль, включая предраковую опухоль или рак, или индивидуум, который проходил лечение такого заболевания, включая индивидуумов, которые были невосприимчивы к проводимому ранее лечению.

Способы согласно изобретению могут быть применены для лечения любой раковой или предраковой опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, раковая опухоль может быть локализована в ткани, выбранной из тканей головного мозга, толстой кишки, мочеполовой системы, легких, почек, предстательной железы, поджелудочной железы, печени, пищевода, желудка, гемопоетической системы, молочной железы, тимуса, яичек, яичника, кожи, костного мозга и/или матки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы и композиции согласно изобретению могут быть использованы для лечения любого ракового заболевания. Раковыми заболеваниями, которые могут быть

подвергнуты лечению с применением способов и композиций согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, раковые поражения клеток мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, толстой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десны, головы, почек, печени, легких, носоглотки, шеи, яичников, предстательной железы, кожи, желудка, яичек, языка или матки. Кроме того, рак может специфически отнесен к нижеследующим гистологическим типам, включая, но не ограничиваясь ими: новообразования, злокачественные опухоли; карциному; недифференцированную карциному; карциному гигантских клеток и веретенообразных клеток; мелкоклеточную карциному; папиллярную карциному; плоскоклеточную карциному; лимфоэпителиальную карциному; базально-клеточную карциному; пиломатриксому; карциному переходных клеток; папиллярную карциному переходных клеток; аденокарциному; гастриному, злокачественную опухоль; холангиокарциному; гепатоцеллюлярную карциному; комбинированную гепатоцеллюлярную карциному и холангиокарциному; трабекулярную аденокарциному; аденоидную кистозную карциному; аденокарциному в аденоматозных полипах; аденокарциному, наследственный полипоз толстой кишки; солидную карциному; карциноидную опухоль, злокачественную карциноидную опухоль; бронхиоло-альвеолярную аденокарциному; папиллярную аденокарциному; хромофобную карциному; ацидофильную карциному; оксифильную аденокарциному; базофильную карциному; прозрачноклеточную аденокарциному; карциному гранулярных клеток; фолликулярную аденокарциному; папиллярную и фолликулярную аденокарциному; неинкапсулирующую склерозирующую карциному; карциному коры надпочечников; эндометриоидную карциному; карциному кожных придатков; апокринную аденокарциному; аденокарциному сальных желез; церуминозную аденокарциному; мукоэпидермоидную карциному; цистаденокарциному; папиллярную цистаденокарциному; папиллярную серозную цистаденокарциному; муцинозную цистаденокарциному; муцинозную аденокарциному; карциному клеток сигнетового кольца; инфильтрирующую карциному протоков; медуллярную карциному; лобулярную карциному; воспалительную карциному; болезнь Педжета,

карциному молочной железы; карциному железистых клеток; плоскоклеточную аденокарциному; аденокарциному с плоскоклеточной метаплазией; злокачественную тимому; злокачественную стромальную опухоль яичника; злокачественную текому; злокачественную опухоль гранулезных клеток и злокачественную робластому; карциному клеток Сертоли; злокачественную опухоль клеток Лейдига, злокачественную опухоль жировых клеток; злокачественную параганглиому; злокачественную параганглиому, не относящуюся к молочной железе; феохромоцитому; гломангеосаркому; злокачественную меланому; беспигментную меланому; поверхностную распространяющуюся меланому; злокачественную меланому гигантского пигментного невуса; меланому эпителиоидных клеток; злокачественный голубой невус; саркому; фибросаркому; злокачественную фиброзную гистиоцитому, миксосаркому, липосаркому; лейомиосаркому; рабдомиосаркому; эмбриональную рабдомиосаркому; альвеолярную рабдомиосаркому; стромальную саркому; злокачественную смешанную опухоль; смешанную опухоль мюллеровских протоков; нефробластому; гепатобластому; карциносаркому; злокачественную мезенхимому; злокачественную опухоль Бреннера; злокачественную филоидную опухоль; синовиальную саркому; злокачественную мезотелиому, дистерминому; эмбриональную карциному; злокачественную тератому, злокачественную стромальную опухоль яичника; хориокарциному; злокачественную мезонефрону, гемангиосаркому; злокачественную гемангиоэндотелиому; саркому Капоши; злокачественную гемангиоперицитому, лимфангиосаркому; остеосаркому; юстакортикальную остеосаркому; хондросаркому; злокачественную хондробластому, мезенхимальную хондросаркому; гигантоклеточную опухоль кости; саркому Юинга; злокачественную одонтогенную опухоль, амелобластную одонтосаркому; злокачественную амелобластому; амелобластную фибросаркому; злокачественную пинеалому, хордому; злокачественную глиому, эпендимому; астроцитому; протоплазматическую астроцитому; фибриллярную астроцитому; астробластому; глиобластому; олигодендроглиому; олигодендробластому; первичную нейроэктодермальную опухоль; саркому мозжечка; ганглионейробластому; нейробластому;

ретинобластому; нейрогенную опухоль обонятельных органов; злокачественную менингиому; нейрофибросаркому; злокачественную нейролеммому; злокачественную опухоль гранулярных клеток; злокачественную лимфому; болезнь Ходжкина; лимфому Ходжкина; парагранулему; злокачественную лимфому; мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому; злокачественную лимфому; диффузную злокачественную крупноклеточную лимфому; злокачественную фолликулярную опухоль; грибовидный микоз; другие специфические неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественную миелому; саркому тучных клеток; иммунопролиферативное заболевание тонкого кишечника; лейкоз; лимфоидный лейкоз; лейкоз клеток плазмы; эритролейкоз; лимфоклеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; лейкоз тучных клеток; мегакариобластный лейкоз; миелоидную саркому; и ретикулоэндотелиоз.

Описанные здесь композиции могут быть доставлены любым подходящим способом введения, включая пероральное введение, интраназальное введение, введение через слизистую, офтальмическое введение, ректальное введение, интравагинальное введение, парентеральное введение, включая внутримышечные, подкожные и интрамедуллярные инъекции, а также интратекальные, прямые интравентрикулярные, внутривенные, внутрисуставные, интрастернальные инъекции, интрасиновиальные инъекции, инъекции в печень, инъекции область поражения, внутричерепные инъекции, внутрибрюшинные инъекции, интраназальные инъекции или внутриглазные инъекции, а также интрацистернальное введение, местное введение, введение в виде порошков, мазей или капель (в том числе глазных капель), включая трансбуккальное и подъязычное введение, трансдермальное введение, введение путем ингаляции в виде спрея или другие способы доставки, известные специалистам.

Используемые здесь термины «системное введение», «вводимый системно», «периферическое введение» и «вводимый периферически» означают введение композиции, содержащей систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-

TSG так, чтобы эта композиция проникала в систему органов пациента и подвергалась там метаболизму и другим подобным процессам.

Используемые здесь термины «парентеральное введение» и «введенный парентерально», означают способы введения, которые отличаются от энтерального и местного введения и обычно осуществляются путем инъекции, и эти способы включает, но не ограничиваются ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутриглазную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и интрастернальную инъекцию, внутриволековую инъекцию и инфузию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции доставляются стандартным способом (например, путем перорального или парентерального введения). В некоторых других вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции доставляются местно путем прямой инъекции в опухоль или прямой инъекции в участок кровоснабжения опухоли (например, артериальный или венозный участок кровоснабжения). В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции доставляются путем общего и местного введения. Так, например, индивидуум с опухолью может быть подвергнут лечению путем прямой инъекции препарата, содержащего описанную здесь композицию, в опухоль или в участок кровоснабжения опухоли в комбинации с пероральным введением фармацевтической композиции согласно изобретению. Если используется местное и общее введение, то местное введение может быть осуществлено до, во время и/или после общего введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы лечения согласно изобретению, в том числе способы лечения раковой или предраковой опухоли включают введение индивидууму описанных здесь композиций в комбинации со вторым средством и/или второй терапией. Термин «в комбинации с...» означает введение системы упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV

(например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG вместе с одним или более терапевтическими средствами, вводимыми одновременно, последовательно или в комбинации. Таким образом, индивидууму, которому вводят комбинацию композиции, содержащей систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG и/или терапевтические средства по отдельности, могут быть введены композиции, содержащие описанную здесь систему упаковки из двух вирусов и одно или более терапевтических средств в одно и то же время (то есть, одновременно) или в разное время (то есть, последовательно, в любом порядке, в один и тот же день или в разные дни), до тех пор пока у индивидуума не будет достигнут эффект комбинации этих средств. При последовательном введении, эти средства могут быть введены с перерывами в 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240 минут или более. В других вариантах осуществления изобретения, средства, вводимые последовательно, могут быть введены с перерывами в 1, 5, 10, 15, 20 или более дней.

При введении в комбинации, эффективная концентрация каждого средства, дающего конкретный биологический ответ, может быть меньше, чем эффективная концентрация каждого средства при его введении по отдельности, что позволяет уменьшить дозу одного или более средств по сравнению с дозой, которая является необходимой при введении только одного средства. Эффекты от введения множества средств могут быть, но необязательно, аддитивными или синергическими. Эти средства могут быть введены несколько раз. При такой комбинированной терапии, терапевтический эффект первого вводимого средства не уменьшается после последовательного, одновременного или отдельного введения последующего средства (последующих средств).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие способы включают введение фармацевтических композиций, содержащих описанные здесь композиции в комбинации с одним или более химиотерапевтическими средствами и/или акцепторными соединениями, включая описанные здесь химиотерапевтические

средства, а также другие известные средства. Комбинированная терапия включает последовательное, одновременное и отдельное или совместное введение композиции так, чтобы терапевтические эффекты от введения композиций, содержащей систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack), полностью не исчезали после введения последующего соединения. В одном из вариантов осуществления изобретения, вторым средством является химиотерапевтическое средство. В другом варианте осуществления изобретения, вторым средством является акцепторное соединение. В другом варианте осуществления изобретения, вторым средством является лучевая терапия. В дополнительном варианте осуществления изобретения, лучевая терапия может быть проведена в дополнение к введению композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе средство может быть приготовлено в виде отдельной фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рассматриваемые фармацевтические композиции согласно изобретению будут включать вещество или вещества, которые должны быть доставлены в количестве, достаточном для введения пациенту терапевтически эффективного количества включенного терапевтического средства или другого соединения как часть профилактического или терапевтического лечения. Желаемая концентрация активного соединения в частице будет зависеть от всасывания, инактивации и скорости экскреции лекарственного средства, а также от скорости доставки соединения. Следует отметить, что величины доз могут также варьироваться в зависимости от тяжести состояния, подвергаемого лечению. Кроме того, следует отметить, что для любого конкретного индивидуума, конкретные схемы введения доз должны быть скорректированы по времени в зависимости от индивидуальной потребности и профессиональной оценки врача, назначающего такое введение композиций или наблюдающего за введением таких композиций. Обычно, дозу вычисляют методами, известными специалистам в данной области.

Доза может быть вычислена исходя из количества композиции,

содержащей систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG на кг массы тела пациента. Так, например, интервалы количеств композиций или соединений, инкапсулированных в этих композициях, рассматривается как величины, составляющие приблизительно 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 или 250 мг или более таких композиций на кг массы тела пациента. Другие количества будут известны и легко определены специалистом в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, доза композиции, содержащей систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG, обычно составляет в пределах приблизительно от 0,001 мг до приблизительно 250 мг на кг массы тела, а в частности, в пределах приблизительно от 50 мг до приблизительно 200 мг на кг, а более конкретно, в пределах приблизительно от 100 мг до приблизительно 200 мг на кг. В одном варианте осуществления изобретения, доза составляет в пределах приблизительно от 150 мг до приблизительно 250 мг на кг. В другом варианте осуществления изобретения, доза составляет приблизительно 200 мг на кг.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молярная концентрация композиции, содержащей систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG, в фармацевтической композиции равна или составляет приблизительно менее, чем 2,5 М, 2,4 М, 2,3 М, 2,2 М, 2,1 М, 2 М, 1,9 М, 1,8 М, 1,7 М, 1,6 М, 1,5 М, 1,4 М, 1,3 М, 1,2 М, 1,1 М, 1 М, 0,9 М, 0,8 М, 0,7 М, 0,6 М, 0,5 М, 0,4 М, 0,3 М или 0,2 М. В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация композиции, содержащей систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG, равна или составляет приблизительно менее, чем 0,10 мг/мл, 0,09 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,07 мг/мл, 0,06 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,04 мг/мл, 0,03 мг/мл или 0,02 мг/мл.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в композициях согласно изобретению и способы введения могут быть изменены в целях получения количества активного ингредиента, которое было бы эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, но при этом не оказывало бы токсического воздействия на пациента.

Выбранный уровень доз будет зависеть от ряда факторов, включая активность конкретного терапевтического средства или его сложного эфира, соли или амида в используемой композиции, способ введения, время введения, скорость экскреции или метаболизма конкретно используемого терапевтического средства, продолжительность лечения, применение других лекарственных средств, соединений и/или веществ, используемых в комбинации с конкретным соединением, возраст, пол, вес, конкретное заболевание, общее состояние здоровья и историю болезни пациента, проходящего лечение и другие факторы, хорошо известные специалистам-медикам.

Квалифицированный врач или ветеринар может легко определить и прописать эффективное количество необходимой фармацевтической композиции. Так, например, врач или ветеринар может прописать и/или ввести дозы соединений согласно изобретению, используемых в фармацевтической композиции на уровнях ниже, чем это требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект.

В общих чертах, подходящая суточная доза соединения согласно изобретению будет представлять собой количество соединения, которое является наименьшей дозой, эффективной для достижения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза будет зависеть от факторов, описанных выше.

При желании, эффективная суточная доза активного соединения может быть введена в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более мелких доз, вводимых отдельно через соответствующие промежутки времени в течение дня и, но необязательно, в виде унифицированных лекарственных форм.

Точное время введения и количество любого конкретного

соединения, которое будет давать наибольший эффект у конкретного пациента, будет зависеть от активности, фармакокинетики и биодоступности конкретного соединения, физиологического состояния пациента (включая возраст, пол, тип и стадию заболевания, общее физическое состояние, восприимчивость к данной дозе и тип лекарственного средства), способа введения и т.п. Представленные здесь руководства могут быть использованы для оптимизации лечения, например, для определения оптимального времени и/или количества вводимого препарата и не требуют более, чем рутинных экспериментов, состоящих из наблюдения за пациентом и корректировки дозы и/или времени введения.

Во время лечения пациента, состояние здоровья пациента может контролироваться путем измерения одного или более из соответствующих показателей в заранее заданные моменты времени в течение 24 часов. Все аспекты лечения, включая дополнительное лечение, количество, время введения и рецептуру, могут быть оптимизированы в соответствии с результатами такого наблюдения. Пациент может периодически обследоваться повторно для определения степени улучшения состояния путем измерения тех же самых параметров, при этом, первую повторную оценку обычно проводят через четыре недели после начала терапии, а затем через каждые 4–8 недель во время терапии, и после этого, через каждые три месяца. Терапия может продолжаться в течение нескольких месяцев или даже лет, при этом, минимальное время проведения терапии для человека составляет один месяц. Исходя из результатов этих повторных оценок можно скорректировать, например, количество (а) вводимого средства и время его (их) введения.

Лечение может быть начато с самых малых доз, которые меньше, чем оптимальная доза соединения. После этого доза может быть увеличена поэтапно с небольшими приращениями, до тех пор, пока не будет достигнут оптимальный терапевтический эффект.

Как описано выше, композиция, содержащая систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) или только rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG, может быть введена в комбинации с лучевой терапией.

Оптимизированная доза лучевой терапии может быть назначена пациенту как суточная доза. Оптимизированные суточные дозы лучевой терапии может составлять, например, приблизительно от 0,25 до 0,5 Гр, приблизительно от 0,5 до 1,0 Гр, приблизительно от 1,0 до 1,5 Гр, приблизительно от 1,5 до 2,0 Гр, приблизительно от 2,0 до 2,5 Гр и приблизительно от 2,5 до 3,0 Гр. Репрезентативная суточная доза может составлять, например, приблизительно от 2,0 до 3,0 Гр. Более высокая доза облучения может быть назначена, например, если опухоль является резистентной к более низким дозам облучения. Высокие дозы облучения могут достигать, например, 4 Гр. Кроме того, общая доза облучения в течение всего курса лечения может составлять, например, в пределах приблизительно от 50 до 200 Гр. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, общая доза облучения в течение всего курса лечения может составлять, например, в пределах приблизительно от 50 до 80 Гр. В некоторых вариантах осуществления изобретения, доза облучения может подаваться с перерывами, например, в 1, 2, 3, 4, или 5 минут, где такой период времени зависит от мощности дозы источника излучения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, суточная доза оптимизированного излучения может подаваться, например, 4 или 5 дней в неделю, в течение приблизительно от 4 до 8 недель. В альтернативном варианте осуществления изобретения, суточная доза оптимизированного облучения может подаваться ежедневно семь дней в неделю, в течение приблизительно от 4 до 8 недель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, суточная доза облучения может подаваться в виде разовой дозы. Альтернативно, суточная доза облучения может подаваться в виде множества доз. В другом варианте осуществления изобретения, оптимизированная доза облучения может быть более высокой, чем доза, которая может переноситься пациентом ежедневно. Таким образом, высокие дозы облучения могут подаваться пациенту, но по схеме менее частого облучения.

Типы излучения, которые могут быть использованы при лечении рака, хорошо известны специалистам и включают электронные пучки,

фотоны высокой энергии, подаваемые от линейного ускорителя или от радиоактивных источников, таких как кобальт или цезий, протоны и нейтроны. Репрезентативным ионизирующим излучением является рентгеновское излучение.

Способы облучения хорошо известны специалистам в данной области. Репрезентативными методами являются, но не ограничиваются ими, облучение внешними пучками, внутренними пучками и введение радиофармацевтических препаратов. При облучении внешними пучками, линейный ускоритель используют для доставки рентгеновского излучения высокой энергии в область тела, пораженного раком. Поскольку источник излучения находится вне тела, то облучение внешними пучками может быть проведено для лечения больших участков тела с равномерной дозой облучения. Внутренняя лучевая терапия, также известная как брахитерапия, включает доставку высокой дозы облучения в определенный участок тела. Внутренняя лучевая терапия двух основных типов включает интерстициальное облучение, где источник излучения помещают в целевую ткань, и внутрисполостное облучение, где источник излучения помещают во внутреннюю полость тела на небольшом расстоянии от пораженного участка. Радиоактивное вещество может также быть доставлено к опухолевым клеткам путем его присоединения к опухоль-специфическим антителам. Радиоактивное вещество, используемое при внутренней лучевой терапии, обычно содержится в небольшой капсуле, в гранулах, в проволоке, в трубке или в имплантате. В противоположность этому, радиофармацевтические препараты представляют собой негерметизированные источники облучения, которые могут быть введены перорально, внутривенно или непосредственно в полость тела.

Лучевая терапия может также включать стереотаксическую хирургическую операцию или стереотаксическую лучевую терапию, где точная доза облучения может подаваться в небольшую область опухоли с использованием линейного ускорителя или гамма-ножа, и трехмерную конформную лучевую терапию (3DCRT), которая представляет собой управляемую компьютером терапию для картирования локализации опухоли до проведения лучевой терапии.

Токсичность и терапевтическая эффективность рассматриваемых соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими методами на клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ и ED₅₀. Композиции, которые дают высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, LD₅₀ (летальная доза) может быть измерена и может быть снижена, например, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или более для композиций, содержащих описанную здесь систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) по сравнению с rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG. Аналогичным образом, ED₅₀ (т.е. концентрация, которая дает полумаксимальное ингибирование симптомов) может быть измерена, и может быть увеличена, например, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или более для композиций, содержащих описанную здесь систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) по сравнению с rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG. Аналогичным образом, IC₅₀ (т.е. концентрация, которая оказывает полумаксимальное цитотоксическое или цитостатическое действие на раковые клетки) может быть измерена и может быть увеличена, например, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или более для композиций, содержащих описанную здесь систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack) по сравнению с rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG. Поскольку могут быть использованы соединения, дающие токсические побочные эффекты, то следует принять меры предосторожности при конструировании системы доставки для нацеливания соединений на нужный участок в целях снижения вероятности появления побочных эффектов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь способы обеспечивают по меньшей мере приблизительно 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или даже 100%-ное ингибирование роста раковых клеток в анализе.

В любом из описанных выше способов, введение композиций, содержащих систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack), может приводить по меньшей мере приблизительно к 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или даже 100%-ному уменьшению солидной злокачественной опухоли у индивидуума по сравнению с солидной злокачественной опухолью перед введением композиций, содержащих систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективное количество композиций, содержащих систему упаковки из двух вирусов (то есть, rAAV (например, rAAV-онко-CRISPR или rAAV-TSG) и Ad-rAAVpack), вводят профилактически для предотвращения образования у индивидуума солидной злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является человек. В других вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является млекопитающее, не являющееся человеком.

Данные, полученные из анализов на культурах клеток и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона доз для их введения человеку. Доза любой добавки или, альтернативно, любых имеющихся в ней компонентов предпочтительно составляет в пределах циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с невысокой токсичностью или в отсутствие какой-либо токсичности. Доза может варьироваться в этих пределах в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Для агентов согласно изобретению, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена исходя из результатов анализов на клеточных культурах. Доза может быть приготовлена для введения животным-моделям для достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме,

которую вычисляют как IC_{50} в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения доз, подходящих для введения человеку. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

IV. Общие определения

Хотя в настоящей заявке используются конкретные термины, однако, они употребляются здесь лишь в общем и описательном смысле, и не носят ограничительный характер. Если это не оговорено особо, все используемые здесь технические и научные термины имеют свои общепринятые значения, известные специалистам в области, к которому относится изобретение.

В соответствии с действующим патентным законодательством, используемые в настоящей заявке и в формуле изобретения артикли «a», «an» и «the» означают «один или более». Так, например, слово «индивидуум» может означать множество индивидуумов, если это не противоречит контексту изобретения (например, множество индивидуумов) и т.п.

Термины «содержат», «содержит» и «содержащий», используемые в данном описании и в формуле изобретения, носят неэксклюзивный смысл, если это не оговорено особо. Аналогичным образом, термин «включать» и его грамматические варианты являются не ограничивающими, то есть, не исключается, что в список перечисленных элементов могут быть внесены и другие подобные элементы, которые могут быть заменены или добавлены к перечисленным элементам.

В соответствии с целями данного описания и прилагаемой формулы изобретения, если это не оговорено особо, все числа, выражающие количества, величины, размеры, пропорции, формы, составы, параметры, проценты, количественные величины и другие численные значения, используемые в описании и в формуле изобретения, следует понимать как измененные во всех случаях при употреблении термина «приблизительно», даже если термин «приблизительно» может явно не указывать на величину, количество или интервал. В соответствии с этим, если это не оговорено особо, то численные параметры, представленные в настоящем

описании и в прилагаемой формуле изобретения, не являются и не должны быть точными, и могут быть приближительными и/или больше или меньше, если это необходимо, что обусловлено допустимыми отклонениями, коэффициентами пересчета, округлениями, погрешностями измерения и т.п., а также другими факторами, известными специалистам, в зависимости от желаемых свойств, которые должны быть получены с помощью описанного здесь предмета изобретения. Так, например, термин «приблизительно», если он относится к численной величине, может охватывать отклонения: в некоторых вариантах осуществления изобретения, $\pm 100\%$, в некоторых вариантах осуществления изобретения, $\pm 50\%$, в некоторых вариантах осуществления изобретения, $\pm 20\%$, в некоторых вариантах осуществления изобретения, $\pm 10\%$, в некоторых вариантах осуществления изобретения, $\pm 5\%$, в некоторых вариантах осуществления изобретения, $\pm 1\%$, в некоторых вариантах осуществления изобретения, $\pm 0,5\%$, а в некоторых вариантах $\pm 0,1\%$ от конкретной величины, где такие отклонения являются допустимыми для осуществления описанных способов или применения описанных композиций.

Кроме того, термин «приблизительно», если он используется по отношению к одному числу или к нескольким числам или числовым интервалам, охватывает все указанные числа, включая все числа в данном интервале, и допускает расширение границ этого интервала выше и ниже представленных численных значений. Перечисление числовых интервалов, определенных конечными точками, включает все числа, например, целые числа, в том числе их дроби, входящие в этот интервал (например, перечисление от 1 до 5 включает 1, 2, 3, 4, и 5, а также их дроби, например, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 и т.п.) и любой интервал в пределах данного интервала.

Примеры

Нижеследующие примеры приводятся как руководство для среднего специалиста по практическому осуществлению репрезентативных вариантов раскрываемого здесь предмета изобретения. Из настоящего описания и общего уровня знаний в данной области, специалистам будет очевидно, что нижеследующие

примеры являются лишь иллюстративными, и что в них может быть внесено множество изменений, модификаций и альтераций, не выходящих за рамки объема раскрываемого здесь предмета изобретения. Описание синтеза и конкретные примеры, приведенные ниже, представлены лишь в иллюстративных целях и никоим образом не должны быть истолкованы как ограничение возможности получения соединений согласно изобретению другими методами.

Пример 1

Система упаковки из двух вирусов для репликации *in vivo* терапевтических аденоассоциированных вирусов.

Предпосылки: Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV) являются предпочтительным вектором для тканеспецифической генотерапии *in vivo*. Эти компактные вирусы являются непатогенными и могут инфицировать как пролиферативные, так и покоящиеся клеточные популяции с высокой эффективностью. AAV дикого типа принадлежат к роду *Dependoparvovirus*, и первоначально были обнаружены в клетках, инфицированных аденовирусом (Ad). Эти простые вирусы содержат только два гена, *тер* и *сар* (фиг. 1). Остальные гены, необходимые для инфекционного цикла AAV, представлены как Ad в транс-ориентации. При конструировании терапевтического rAAV, вирусные гены дикого типа заменяются трансгенами. Поэтому rAAV должен быть упакован *in vitro*. В стандартной системе упаковки rAAV, некоторые из требуемых транс-факторов обеспечиваются унаковывающей клеточной линией 293, которая первоначально была создана путем трансформации клеток почек человеческого эмбриона аденовирусной ДНК. Остальные транс-факторы, включая гены *тер* и *сар* AAV, доставляются в плазмиды, которые котрансфицируют вместе с вирусной трансгенной конструкцией. Только вирусные генетические элементы, сохраняющиеся в «некишечных» rAAV, представляют собой два инвертированных концевых повтора (ITR). В результате, инфекционные вирусные частицы, генерируемые путем упаковки *in vitro*, являются дефицитными по репликации.

Трансгены могут быть эффективно доставлены в ткани посредством rAAV, но этот процесс представляет собой «однократную обработку», причем, поблизости от участка инъекции

новый вирус не генерируются. Для многих применений, однократное введение rAAV может изменять число клеток-мишеней, что является достаточным для достижения значимого клинического ответа. Для других применений, число клеток, которые могут быть модифицированы путем однократной обработки rAAV, может оказаться недостаточным для достижения желаемого ответа. Это ограничение имеет особое значение для терапевтического применения rAAV при лечении опухолевых заболеваний, в которых ткани являются неупорядоченными, а число клеток-мишеней имеет тенденцию к увеличению.

Настоящее изобретение относится к вирусной системе, в которой терапевтический rAAV может итеративно реплицироваться *in vivo*. В основе этой системы лежит новое производное аденовируса 5, обозначаемое Ad-rAAVpack, где гены *rep* и *cap*, происходящие от AAV дикого типа, присутствуют вместо гена Ad E3 (фиг. 2). Ad E3, по своей природе, позволяет вирусу «ускользнуть» от иммунного надзора хозяина, но он не требуется ни для литической инфекции, ни для упаковки AAV. Поскольку кластер *rep-cap* только на ~1 т.п.о. превышает размер гена E3, то общий размер Ad-rAAVpack четко соответствует упаковывающей емкости опубликованного Ad.

Ad-rAAVpack имеет все транс-элементы, необходимые для репликации и упаковки партнера rAAV. Поэтому, коинфицирование тканей-мишеней Ad-rAAVpack и терапевтическим rAAV позволяет rAAV реплицироваться *in vivo*, что может повышать эффективность доставки трансгена. В конечном счете, уровень двойного инфицирования может быть ограничен иммунным ответом у хозяина.

Пример 2

Методы

Конструирование плазмиды: Для получения двунаправленной конструкции H1, человеческий ген *cas9*, оптимизированный по кодонам, и терминатор SV40 присоединяли к промотору H1 размером в 230 п.о., где транскрипт Pol II является эндогенным (минус-цепь). Между промотором H1 и каркасом рНК был сконструирован сайт *AvrII* для инсерции таргетирующей последовательности. Затем конструкцию «SV40[rev]::*hcas9*[rev]::H1::каркас рНК::терминаторная последовательность *pol III*» клонировали в

NdeI/XbaI-гидролизат вектора pUC19. Для получения различных рРНК, используемых в этом исследовании, перекрывающиеся олигонуклеотиды подвергали отжигу и амплифицировали с помощью ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Phusion Flash для двухстадийной амплификации (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), после чего очищали с использованием модифицированных карбоксилатом магнитных сфер Sera-Mag (Thermo Fisher Scientific), смешанных с 2х объемом 25% ПЭГ и 1,5М NaCl. Затем, очищенные ПЦР-продукты ресуспендировали в H₂O и количественно оценивали с использованием NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). рРНК-экспрессирующие конструкции получали путем сборки Гибсона (New England Biolabs, Ipswich, MA) (Gibson et al. (2009) *Nature Methods* 6:343-345) с небольшими модификациями. Общий реакционный объем снижали с 20 мкл до 2 мкл.

Клеточную линию 293Т почек человеческого эмбриона (НЕК) (Life Technologies, Grand Island, NY) поддерживали при 37°C с 5% CO₂/20% O₂ в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) (Invitrogen), в которую были добавлены 10% фетальная бычья сыворотка (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) и 2 мМ GlutaMAX (Invitrogen).

Экспериментальный анализ и секвенирующий анализ на геномную модификацию: Для проведения экспериментального анализа, геномную ДНК экстрагировали путем ресуспендирования клеток в растворе QuickExtract (Epicentre, Madison, WI) с последующим инкубированием при 65°C в течение 15 минут, а затем при 98°C в течение 10 минут. Раствор экстракта осветляли с использованием реагента для очистки и концентрирования ДНК (Zymo Research, Irvine, CA) и количественно оценивали с помощью NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Геномную область, окружающую сайты-мишени CRISPR, амплифицировали из 100 нг геномной ДНК с использованием ДНК-полимеразы Phusion (New England Biolabs). Продукты множества независимых ПЦР-реакций объединяли и очищали на центрифужной колонке Qiagen MinElute Spin в соответствии с протоколом производителя (Qiagen, Valencia, CA). Объем 8 мкл, содержащий 400 нг ПЦР-продукта в 12,5 мМ трис-HCl (pH 8,8), 62,5 мМ KCl и

1,875 мМ MgCl₂, денатурировали и медленно подвергали повторному отжигу для стимуляции образования гетеродуплексов: 95°C в течение 10 минут в понижающем градиенте 95°C–85°C при 1,0°C/секунду, 85°C в течение 1 секунды, 85°C–75°C при -1,0°C/секунду, 75°C в течение 1 секунды, 75°C–65°C при -1,0°C/секунду, 65°C в течение 1 секунды, 65°C–55°C при -1,0°C/секунду, 55°C в течение 1 секунды, 55°C–45°C при -1,0°C/секунду, 45°C в течение 1 секунды, 45°C–35°C при -1,0°C/секунду, 35°C в течение 1 секунды, 35°C–25°C при -1,0°C/секунду, а затем выдерживали при 4°C. 1 мкл контрольного энхансера и 1 мкл контрольной нуклеазы (Transgenomic, Omaha, NE) добавляли к каждой реакционной смеси, инкубировали при 42°C в течение 60 минут, после чего к реакционной смеси добавляли 1 мкл раствора для прекращения реакции. 1 мкл реакционной смеси количественно оценивали на биоанализаторе 2100 с использованием ДНК-чипа 1000 (Agilent, Santa Clara, CA). Для анализа в геле, к оставшейся реакционной смеси добавляли 2 мкл загрузочного 6х буфера (New England Biolabs) и загружали на 3% агарозный гель, содержащий этидийбромид. Гели визуализировали на визуализирующей системе Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, NY) и количественно оценивали с использованием программы ImageJ v. 1,46. Частоту NHEJ вычисляли по двухчленному уравнению:

$$1 - \sqrt{1 - \frac{(a+b)}{(a+b+c)}} \times 100$$

% модификации гена=

где величины «а» и «b» равны суммарной площади расщепленных фрагментов после вычитания фона, а «с» равно суммарной площади нерасщепленных ПЦР-продуктов после вычитания фона (Guschin *et al.* (2010) *Methods in Molecular Biology* 649: 247-256).

В лаборатории была разработана программа (<http://crispr.technology>) для конструирования уникальных рРНК, которые были подвергнуты отжигу для создания рецидивизирующих онкогенных мутаций. Эти рРНК могут регулировать CRISPR/Cas9-опосредуемую дизрупцию этих мутантных аллелей. Внутриопухолевая доставка этих рРНК вместе с белком Cas9 может ингибировать рост опухолей, содержащих эти мутации. Специфические онкогены,

подавляемые таким образом, представлены ниже:

Онкоген	Мутация	Ген-специфическая
KRAS	G13D	GTAGTTGGAGCTGGTGACGTAGG (SEQ ID NO: 1)
KRAS	G12C	GTAGTTGGAGCTTGTGGCGTAGG (SEQ ID NO: 2)
KRAS	G12D	GTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGG (SEQ ID NO: 3)
PIK3CA	E345K	TCTCTCTGAAATCACTAAGCAGG (SEQ ID NO: 4)
PIK3CA	D549N	AAGATTTTCTATGGAGTCACAGG (SEQ ID NO: 5)
PIK3CA	H1047R	CAAATGAATGATGCACGTCATGG (SEQ ID NO: 6)
IDH1	R132H	ATCATAGGTCGTCATGCTTATGG (SEQ ID NO: 7)
	R132H	TCATAGGTCGTCATGCTTATGGG (SEQ ID NO: 8)
	R132H	CATAGGTCGTCATGCTTATGGGG (SEQ ID NO: 9)
	R132H	GCATGACGACCTATGATGATAGG (SEQ ID NO: 10)

В итоге было обнаружено, что эти специфические мутации в KRAS и PIK3CA присутствуют в большинстве раковых опухолей в легких и по всему желудочно-кишечному тракту. Мутация IDH1 R132 была обнаружена приблизительно в 30% глиом. Такие опухоли головного мозга являются особенно резистентными ко всем стандартным формам терапии. Каждая из этих pPHK нацелена, главным образом, на мутантный аллель.

Человеческий H1::мишень:каркас pPHK

Мишень: KRAS дикого типа

GGAATTTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACТА
GGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC
GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTG
TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 11)

Человеческий H1::мишень:каркас pPHK

Мишень: KRAS G12C

GGAATTTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACТА
GGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC

GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
 GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCGTAGTTGGAGCTTGTGGCGTG
 TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
 CGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 12)

Человеческий H1::мишень:каркас рРНК

Мишень: KRAS G12D

GGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACTA
 GCGGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC
 GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
 GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCGTAGTTGGAGCTGATGGCGTG
 TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
 CGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 13)

Человеческий H1::мишень:каркас рРНК

Мишень: KRAS G13D

GGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACTA
 GCGGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC
 GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
 GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCGTAGTTGGAGCTGGTGACGTG
 TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
 CGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 14)

Человеческий H1::мишень:каркас рРНК

Мишень: PIK3CA дикого типа

GGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACTA
 GCGGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC
 GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
 GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCG
 TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
 CGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 15)

Человеческий H1::мишень:каркас рРНК

Мишень: PIK3CA E545K

GGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACTA
 GCGGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC
 GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
 GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCTCTCTCTGAAATCACTAAGCG
 TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
 CGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 16)

Человеческий H1::мишень:каркас рРНК*Мишень: PIK3CA E549N*

GGAATTTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACTA
GGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC
GCCCTGCAATATTTGCATGTCGSTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCAAGATTTTCTATGGAGTCACG
TTTTAGAGSTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 17)

Человеческий H1::мишень:каркас рРНК*Мишень: PIK3CA H1047R*

GGAATTTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACTA
GGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC
GCCCTGCAATATTTGCATGTCGSTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCAAATGAATGATGCACGTCAG
TTTTAGAGSTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCAC
CGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 18)

Ссылки

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие документы, упомянутые в настоящей заявке, являются показателями уровня техники в области, к которому относится раскрываемый здесь предмет изобретения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие документы, упомянутые в настоящей заявке, вводятся в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы каждая отдельная публикация, патентная заявка, патент и другой документ были конкретно и отдельно введены в настоящее описание посредством ссылки. Следует отметить, что хотя в настоящем изобретении указан ряд патентных заявок, патентов и других документов, однако, это никоим образом не должно означать, что любой из этих документов является частью общих знаний в данной области техники.

Хотя вышеупомянутый предмет изобретения подробно описан со ссылками на чертежи и примеры для лучшего понимания изобретения, однако, для специалиста очевидно, что в настоящее изобретение могут быть внесены некоторые изменения и модификации, не выходящие за рамки объема прилагаемой формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY

<120> КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ CRISPR/CAS9 И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

<130> JHV-16025

<140> PCT/US2017/040696

<141> 2017-07-05

<150> 62/358,339

<151> 2016-07-05

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 1

gtagttggag ctggtgacgt agg

23

<210> 2

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 2

gtagttggag cttgtggcgt agg

23

<210> 3

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 3

gtagttggag ctgatggcgt agg

23

<210> 4

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический

олигонуклеотид

<400> 4
tctctctgaa atcactaagc agg 23

<210> 5
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
олигонуклеотид

<400> 5
aagattttct atggagtcac agg 23

<210> 6
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
олигонуклеотид

<400> 6
caaatgaatg atgcacgtca tgg 23

<210> 7
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
олигонуклеотид

<400> 7
atcataggtc gtcattgctta tgg 23

<210> 8
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
олигонуклеотид

<400> 8
tcataggtcg tcatgcttat ggg 23

<210> 9
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 9
cataggtcgt catgcttatg ggg 23

<210> 10
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 10
gcatgacgac ctatgatgat agg 23

<210> 11
<211> 326
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 11
ggaattcгаа cgctgacgtc atcaaccgc tccaaggaat cgcgggcccа gtgtcactag 60
gсggгаасас ссagсgсgсg tgcgсcctgg caggaagatg gctgtgaggg acaggggagt 120
ggcgcсcctgc аatatttgca tgtcgctatg tgttctggga аatсaccata аacgtgaaat 180
gtctttggat ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actttttccc gtagttggag 240
ctggtggcgt gttttagagc tagaaatagc аagttaaaat аaggctagtc сgttatcaac 300
ttgaaaaagt ggcaccgagt сggtgc 326

<210> 12
<211> 326
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 12
ggaattcгаа cgctgacgtc atcaaccgc tccaaggaat cgcgggcccа gtgtcactag 60
gсggгаасас ссagсgсgсg tgcgсcctgg caggaagatg gctgtgaggg acaggggagt 120
ggcgcсcctgc аatatttgca tgtcgctatg tgttctggga аatсaccata аacgtgaaat 180
gtctttggat ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actttttccc gtagttggag 240
cttgtggcgt gttttagagc tagaaatagc аagttaaaat аaggctagtc сgttatcaac 300
ttgaaaaagt ggcaccgagt сggtgc 326

<210> 13
<211> 326
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 13

ggaattcgaa cgctgacgtc atcaaccgcg tccaaggaat cgcgggccca gtgtcactag 60
gcgggaaacac ccagcgcgcg tgcgccctgg caggaagatg gctgtgaggg acaggggagt 120
ggcgccctgc aatatttgca tgtcgctatg tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat 180
gtctttggat ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actttttccc gtagttggag 240
ctgatggcgt gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac 300
ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 326

<210> 14
<211> 326
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 14

ggaattcgaa cgctgacgtc atcaaccgcg tccaaggaat cgcgggccca gtgtcactag 60
gcgggaaacac ccagcgcgcg tgcgccctgg caggaagatg gctgtgaggg acaggggagt 120
ggcgccctgc aatatttgca tgtcgctatg tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat 180
gtctttggat ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actttttccc gtagttggag 240
ctggtgacgt gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac 300
ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 326

<210> 15
<211> 326
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 15

ggaattcgaa cgctgacgtc atcaaccgcg tccaaggaat cgcgggccca gtgtcactag 60
gcgggaaacac ccagcgcgcg tgcgccctgg caggaagatg gctgtgaggg acaggggagt 120
ggcgccctgc aatatttgca tgtcgctatg tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat 180

gtctttggat ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actttttccc tctctctgaa 240
atcactgagc gtttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac 300
ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 326

<210> 16
<211> 326
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид

<400> 16
ggaattcгаа cgctgacgtc atcaaccgсгc tccaaggaat cgсgggссса gtgtcactag 60
gсgggaасас ссagсgсgсg tgcgссctgg сaggaagatg gctgtgaggg acaggggagt 120
ggсgссctgc аatatttgca tgtcgctatg tgttctggga аatсaccata аacgtgaaat 180
gtctttggat ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actttttccc tctctctgaa 240
atcactaagc gtttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac 300
ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 326

<210> 17
<211> 326
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид

<400> 17
ggaattcгаа cgctgacgtc atcaaccgсгc tccaaggaat cgсgggссса gtgtcactag 60
gсgggaасас ссagсgсgсg tgcgссctgg сaggaagatg gctgtgaggg acaggggagt 120
ggсgссctgc аatatttgca tgtcgctatg tgttctggga аatсaccata аacgtgaaat 180
gtctttggat ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actttttccc аagattttct 240
atggagtcac gtttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac 300
ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 326

<210> 18
<211> 326
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид

<400> 18
ggaattcгаа cgctgacgtc atcaaccgсгc tccaaggaat cgсgggссса gtgtcactag 60

gcgggaacac ccagcgcgcg tgcgccctgg caggaagatg gctgtgaggg acaggggagt 120
 ggcgccctgc aatatttgca tgtcgctatg tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat 180
 gtctttggat ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actttttccc caaatgaatg 240
 atgcacgtca gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac 300
 ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 326

<210> 19
 <211> 122
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<220>
 <221> CDS
 <222> (12)..(122)

<400> 19
 gcctgctgaa a atg act gaa tat aaa ctt gtg gta gtt gga gct ggt gac 50
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp
 1 5 10

gta ggc aag agt gcc ttg acg ata cag cta att cag aat cat ttt gtg 98
 Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val
 15 20 25

gac gaa tat gat cca aca ata gag 122
 Asp Glu Tyr Asp Pro Thr Ile Glu
 30 35

<210> 20
 <211> 37
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 20
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu
 35

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ профилактики, ингибирования или лечения рака у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный способ включает:

(a) получение не встречающейся в природе нуклеазной системы, содержащей один или более векторов, включающих:

i) промотор, функционально присоединенный по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке индивидуума, и где молекула ДНК кодирует один или более онкогенных продуктов, экспрессирующихся в клетке; и

ii) регуляторный элемент, действующий в клетке и функционально присоединенный к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу, где компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов; и

(b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества этой системы.

2. Способ по п. 1, также включающий стадию получения рекомбинантного аденовируса, упаковывающего аденоассоциированный вирус (Ad-rAAVpack).

3. Способ по п. 2, где Ad-rAAVpack вводят одновременно или вместе с нуклеазной системой.

4. Способ по п. 1, где системой является CRISPR-cas9.

5. Способ по п. 1, где систему упаковывают в частицу одного аденоассоциированного вируса (AAV).

6. Способ по п. 1, где аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, содержит по меньшей мере одну делецию в аденовирусном гене.

7. Способ по п. 6, где аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, выбран из аденовируса серотипа 2, аденовируса серотипа 5 или аденовируса серотипа 35.

8. Способ по п. 7, где упаковывающим вирусом является

аденовирус серотипа 5.

9. Способ по любому из п.п. 6-8, где аденовирусный ген выбран из E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 или L5.

10. Способ по п. 9, где аденовирусным геном является E3.

11. Способ по п. 1, где система инактивирует один или более генных продуктов.

12. Способ по п. 1, где нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну генную мутацию.

13. Способ по п. 1, где промотором является промотор H1.

14. Способ по п. 13, где промотор H1 является двунаправленным.

15. Способ по п. 14, где промотор H1 включает:

а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и

б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную на геном, в противоположном направлении.

16. Способ по п. 1, где нуклеазой, нацеленной на геном, является белок cas9.

17. Способ по п. 16, где белок cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке.

18. Способ по любому из п.п. 13-15, где промотор функционально присоединен по меньшей мере к одной, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти рРНК.

19. Способ по п. 1, где последовательностью-мишенью является онкоген или ген-супрессор опухоли.

20. Способ по п. 1, где последовательностью-мишенью является онкоген, содержащий по меньшей мере одну мутацию.

21. Способ по любому из п.п. 18-20, где последовательностью-мишенью является онкоген, выбранный из группы, состоящей из Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, АКТ, с-мус, β -катенина, PDGF, С-MET, PI3K-110a, CDK4, циклина B1, циклина D1, гена рецептора эстрогена, гена рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолога 1 вирусного

онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолога 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолога 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антигена PyV MT и T-антигена SV40.

22. Способ по п. 20, где последовательность-мишень представляет собой онкоген, выбранный из KRAS, PIK3CA или IDH1.

23. Способ по п. 22, где последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является KRAS.

24. Способ по п. 23, где KRAS содержит мутацию, выбранную из G13D, G12C или G12D.

25. Способ по любому из п.п. 23-24, где последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14 или их комбинаций.

26. Способ по п. 22, где последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является PIK3CA.

27. Способ по п. 26, где PIK3CA содержит мутацию, выбранную из E345K, D549N или H1047R.

28. Способ по любому из п.п. 26-27, где последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18 или их комбинаций.

29. Способ по п. 22, где последовательностью-мишенью является онкоген, который представляет собой IDH1.

30. Способ по п. 29, где IDH1 содержит мутацию R132H.

31. Способ по п. 1, где последовательность pРНК выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-10, или их комбинаций.

32. Способ по п. 1, где нуклеазную систему вводят системно.

33. Способ по п. 32, где системное введение выбрано из группы, состоящей из перорального, внутривенного, интрадермального, внутрибрюшинного, подкожного и внутримышечного введения.

34. Способ по п. 1, где нуклеазную систему вводят вовнутрь

опухоли или в участок возле опухоли.

35. Способ по п. 1, где индивидууму вводят по меньшей мере одно дополнительное противораковое средство.

36. Способ по п. 35, где противораковое средство выбрано из группы, состоящей из паклитаксела, цисплатина, топотекана, гемцитабина, блеомицина, этопозиды, карбоплатина, доцетаксела, доксорубицина, топотекана, циклофосфида, трабектедина, олапариба, тамоксифена, летрозолы и бевацизумаба.

37. Способ по п. 1, где индивидууму проводят по меньшей мере одну дополнительную противораковую терапию.

38. Способ по п. 37, где противораковой терапией является лучевая терапия, химиотерапия или хирургическое вмешательство.

39. Способ по п. 1, где раком является солидная опухоль.

40. Способ по п. 1, где рак выбран из группы, состоящей из рака головного мозга, рака желудочно-кишечного тракта, рака ротовой полости, рака молочной железы, рака яичника, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, рака печени, рака горла, рака желудка и рака почек.

41. Способ по п. 40, где рак представляет собой рак головного мозга.

42. Способ по п. 1, где индивидуумом является млекопитающее.

43. Способ по п. 33, где индивидуумом является человек.

44. Способ по п. 1, где пролиферацию клеток у индивидуума ингибируют или снижают.

45. Способ по п. 1, где злокачественную опухоль у индивидуума ингибируют или снижают.

46. Способ по п. 1, где некроз опухоли у индивидуума усиливают или повышают.

47. Способ изменения уровня экспрессии одного или более генов в клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более генов, где указанный способ включает введение в клетку:

(i) не встречающейся в природе нуклеазной системы, содержащей один или более векторов, включающих:

а) промотор, функционально присоединенный по меньшей мере к

одной нуклеотидной последовательности, кодирующей руководящую РНК нуклеазной системы (рРНК), где рРНК гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и

b) регуляторного элемента, действующего в клетке и функционально присоединенного к нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу, где компоненты (a) и (b) расположены в одном и том же или в различных векторах системы, где рРНК нацелена на последовательность-мишень и гибридизуется с этой мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК, что приводит к изменению уровня экспрессии одного или более генных продуктов.

48. Способ по п. 47, также включающий получение рекомбинантного аденовируса, упаковывающего аденоассоциированный вирус (Ad-rAAVpack).

49. Способ по п. 48, где Ad-rAAVpack вводят одновременно или вместе с нуклеазной системой.

50. Способ по п. 47, где системой является CRISPR-cas9.

51. Способ по п. 47, где систему упаковывают в частицу одного аденоассоциированного вируса (AAV).

52. Способ по п. 47, где упаковывающий вирус содержит по меньшей мере одну делецию в аденовирусном гене.

53. Способ по п. 52, где аденовирус, упаковывающий аденоассоциированный вирус, выбран из аденовируса серотипа 2, аденовируса серотипа 5 или аденовируса серотипа 35.

54. Способ по п. 53, где вирус, упаковывающий аденовирус, представляет собой аденовирус серотипа 5.

55. Способ по любому из п.п. 52-54, где аденовирусный ген выбран из E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 или L5.

56. Способ по п. 55, где аденовирусным геном является E3.

57. Способ по п. 47, где система инактивирует один или более генных продуктов.

58. Способ по п. 47, где нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну генную мутацию.

59. Способ по п. 47, где промотором является промотор H1.

60. Способ по п. 59, где промотор H1 является двунаправленным.

61. Способ по п. 60, где промотор N1 включает:

а) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей рРНК, в одном направлении; и

б) регуляторные элементы, которые обеспечивают транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу, нацеленную на геном, в противоположном направлении.

62. Способ по п. 47, где нуклеазой, нацеленной на геном, является белок cas9.

63. Способ по п. 62, где белок cas9 был оптимизирован по кодонам для экспрессии в клетке.

64. Способ по любому из п.п. 59-61, где промотор функционально присоединен по меньшей мере к одной, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти рРНК.

65. Способ по п. 47, где последовательностью-мишенью является онкоген или ген-супрессор опухоли.

66. Способ по п. 47, где последовательностью-мишенью является ген-драйвер рака, выбранный из группы, состоящей из EP300, FBXW7, GATA1, GATA2, NOTCH1, NOTCH2, EXT1, EXT2, PTCH1, SMO, SPOP, SUFU, APC, AXIN1, CDH1, CTNNB1, EP300, FAM123B, GNAS, HNF1A, NF2, PRKAR1A, RNF43, SOX9, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATRX, CREBBP, DNMT1, DNMT3A, EP300, EZH2, H3F3A, HIST1H3B, IDH1, IDH2, KDM5C, KDM6A, MEN1, MLL2, MLL3, NCOA3, NCOR1, PAX5, PBRM1, SETD2, SETBP1, SKP2, SMARCA4, SMARCB1, SPOP, TET2, WT1, AR, BCOR, CREBBP, DAXX, DICER1, GATA3, IKZF1, KLF4, LMO1, PHOX2B, PHF6, PRDM1, RUNX1, SBDS, SF3B1, SRSF2, U2AF1, ABL1, BCL2, CARD11, CASP8, CCND1, CDC73, CDK4, CDKN2A, CDKN2C, CYLD, DAXX, FUBP1, MDM2, MDM4, MED12, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NFE2L2, NPM1, PPM1D, PPP2R1A, RB1, TNFAIP3, TRAF7, TP53, ALK, B2M, BRAF, CBL, CEBPA, CSF1R, CIC, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, NRAS, NF1, PDGFRA, PTPN11, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, VHL, AKT1, ALK, B2M, CBL, CEBPA, CSF1R, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, FH, FLCN, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, GPC3, KIT, MET, NKX21, PRKAR1A, PIK3CA, PIK3R1, PDGFRA, PTEN, RET, SDH5, SDH8, SDHC, SDHD, STK11, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WAS, CRLF2, FGFR2, FGFR3, FLT3, JAK1, JAK2,

JAK3, KIT, MPL, SOCS1, VHL, B2M, CEBPA, ERK1, GNA11, GNAQ, MAP2K4, MAP3K1, NKX21, TNFAIP3, TSHR, WAS, ACVR1B, BMPR1A, FOXL2, GATA1, GATA2, GNAS, EP300, MED12, SMAD2, SMAD4, ATM, BAP1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BUB1B, CHEK2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBS1, PALB2, PMS1, PMS2, RECQL4, STAG2, TP53, WRN, XPA и XPC.

67. Способ по любому из п.п. 64-65, где последовательность-мишенью является онкоген, выбранный из группы, состоящей из Her2, PIK3CA, KRAS, HRAS, IDH1, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, AKT, c-мус, β -катенина, PDGF, C-MET, PI3K-110a, CDK4, циклина B1, циклина D1, гена рецептора эстрогена, гена рецептора прогестерона, ErbB1 (гомолога 1 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), ErbB3 (гомолога 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), PLK3, KIRREL, ErbB4 (гомолога 4 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2), TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, Bcl2, антигена PyV МТ и Т-антигена SV40.

68. Способ по п. 18, где последовательность-мишень представляет собой онкоген, выбранный из KRAS, PIK3CA или IDH1.

69. Способ по п. 68, где последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является KRAS.

70. Способ по п. 69, где KRAS содержит мутацию, выбранную из G13D, G12C или G12D.

71. Способ по любому из п.п. 69-70, где последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14 или их комбинаций.

72. Способ по п. 66, где последовательность-мишень представляет собой онкоген, где указанным онкогеном является PIK3CA.

73. Способ по п. 70, где PIK3CA содержит мутацию, выбранную из E345K, D549N или H1047R.

74. Способ по любому из п.п. 70-71, где последовательность-мишень выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-18 или их

комбинаций.

75. Способ по п. 66, где последовательностью-мишенью является онкоген, который представляет собой IDH1.

76. Способ по п. 73, где IDH1 содержит мутацию R132H.

77. Способ по п. 47, где последовательность рРНК выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-10 или их комбинаций.

78. Способ по п. 47, где экспрессия одного или более генных продуктов является пониженной.

79. Способ по п. 47, где клеткой является эукариотическая или не-эукариотическая клетка.

80. Способ по п. 79, где эукариотической клеткой является клетка млекопитающего или человека.

81. Способ по п. 80, где эукариотической клеткой является раковая клетка.

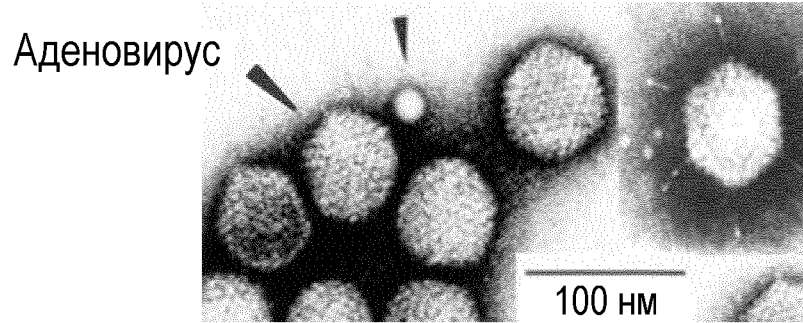
82. Способ по п. 47, где пролиферация этих клеток ингибируется или снижается.

83. Способ по п. 47, где апоптоз этих клеток усиливается или повышается.

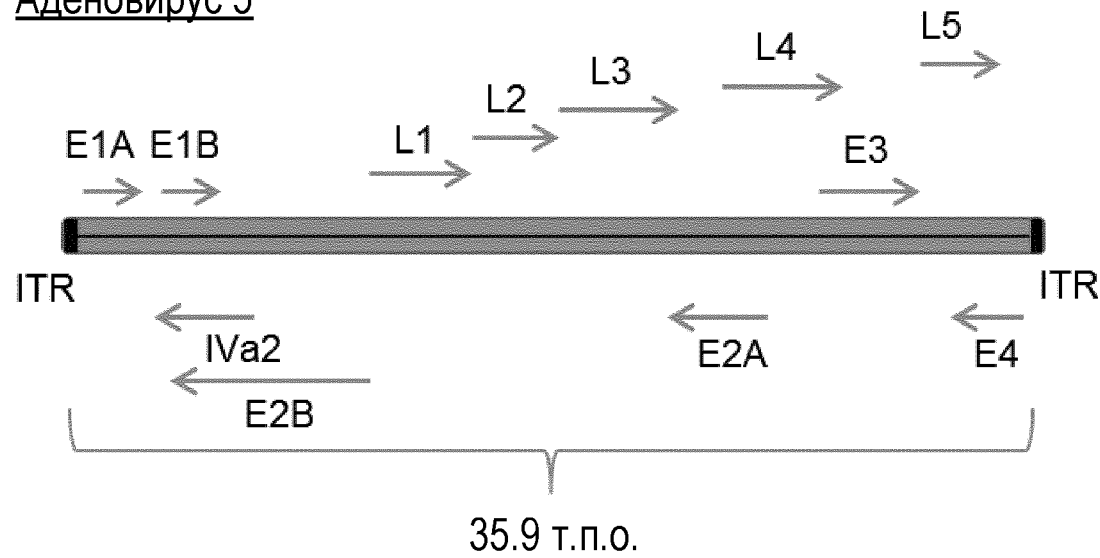
По доверенности

ФИГ.1

Аденоассоциированный вирус

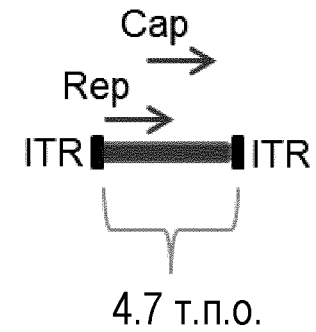


Аденовирус 5



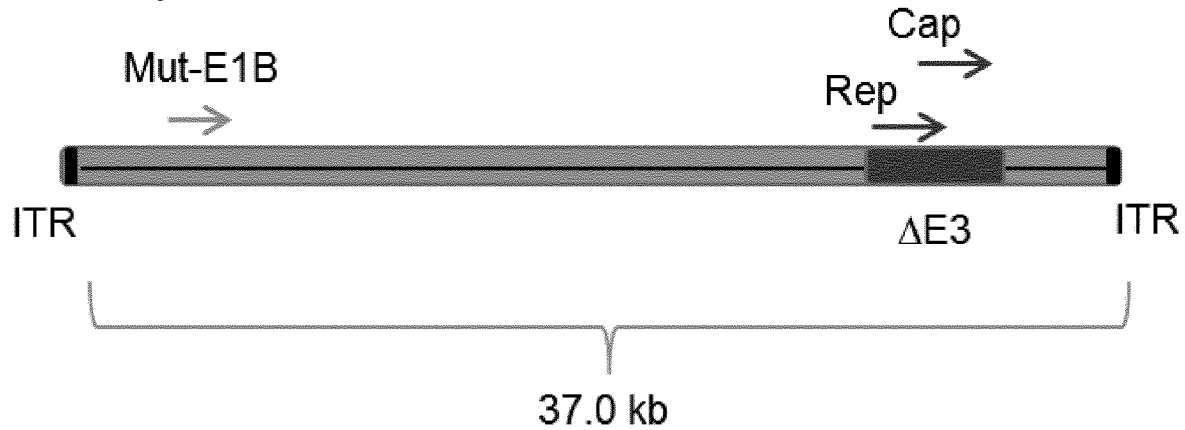
Аденоассоциированный вирус 2

1/8

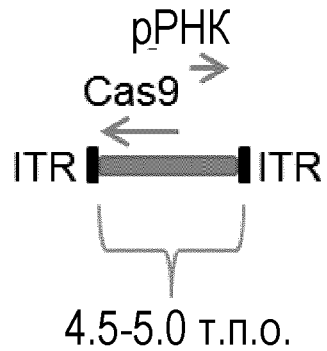


ФИГ.2

Ad-rAAVpack

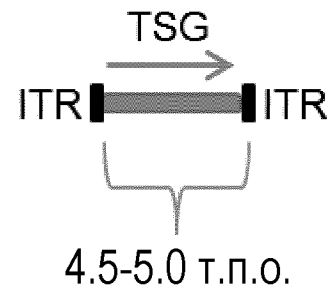


rAAV-Онко-CRISPR



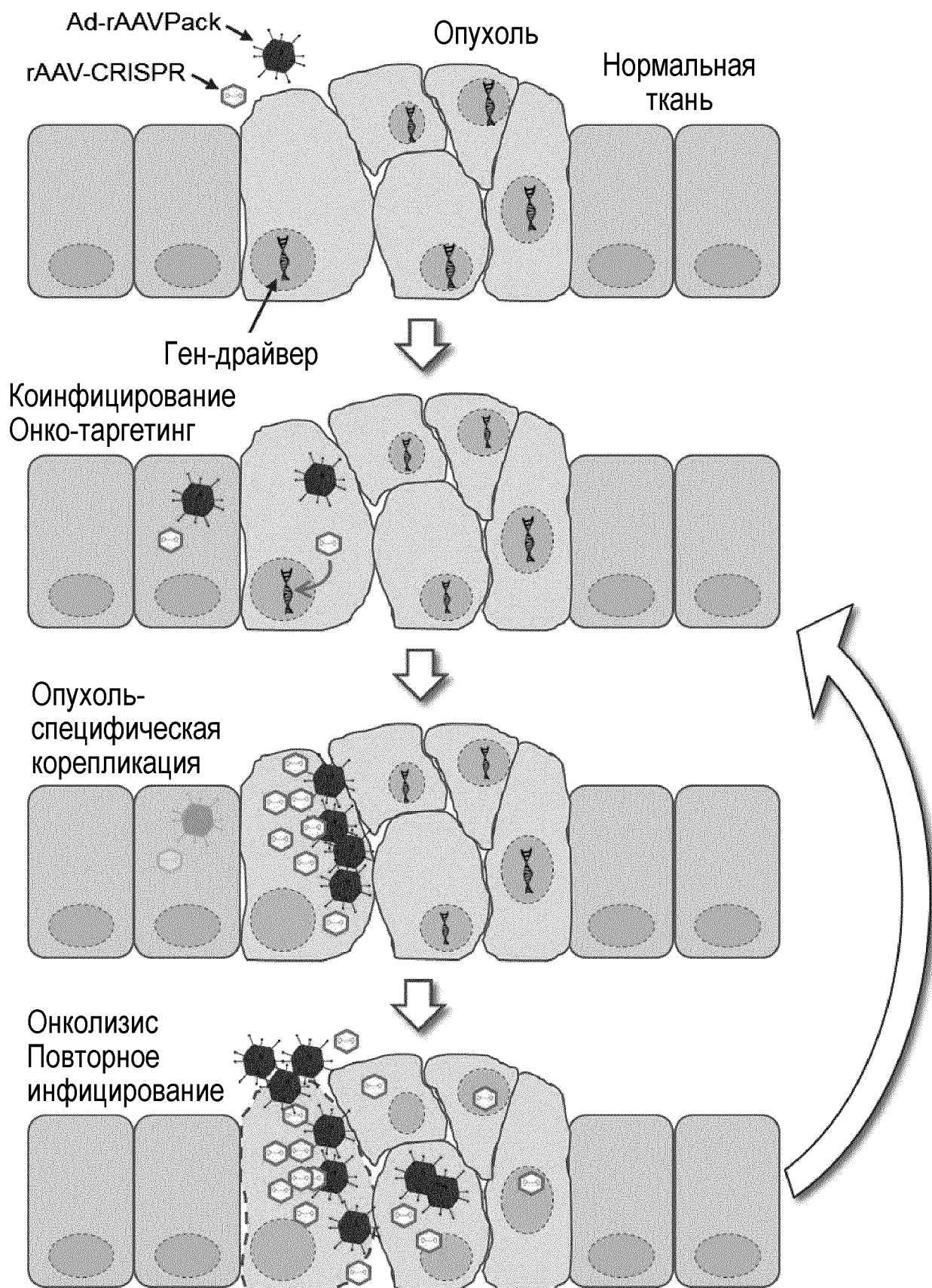
или

rAAV-TSG

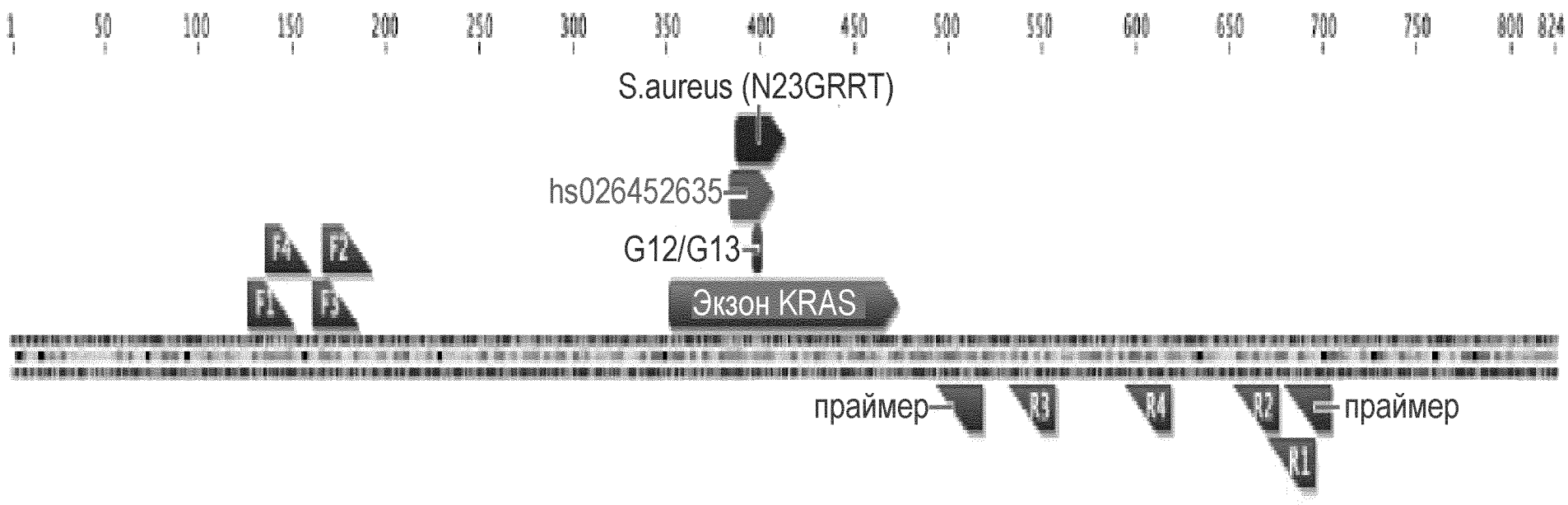


например: TP53, PTEN,
IFN, CD28

ФИГ.3

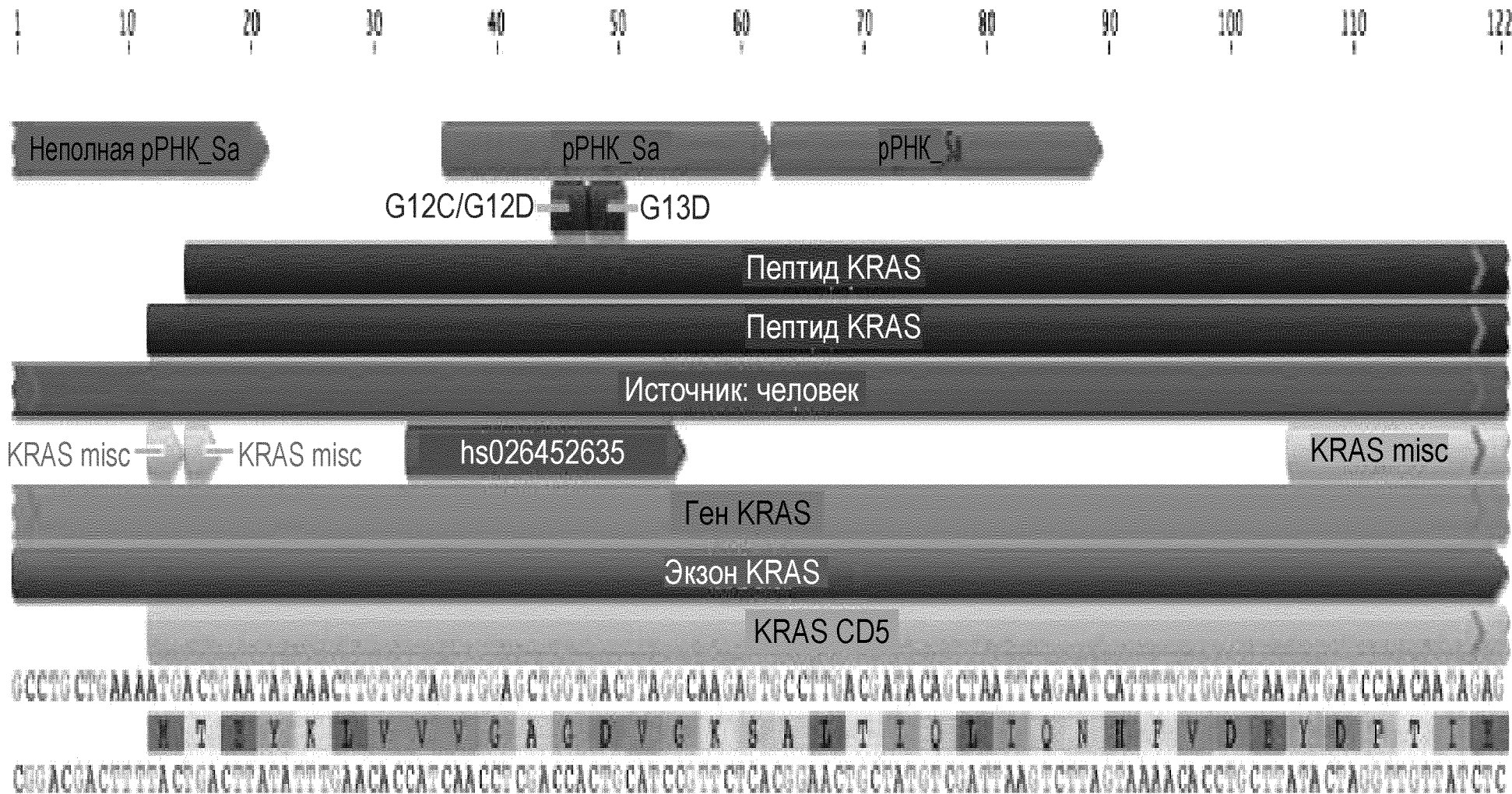


ФИГ.4А

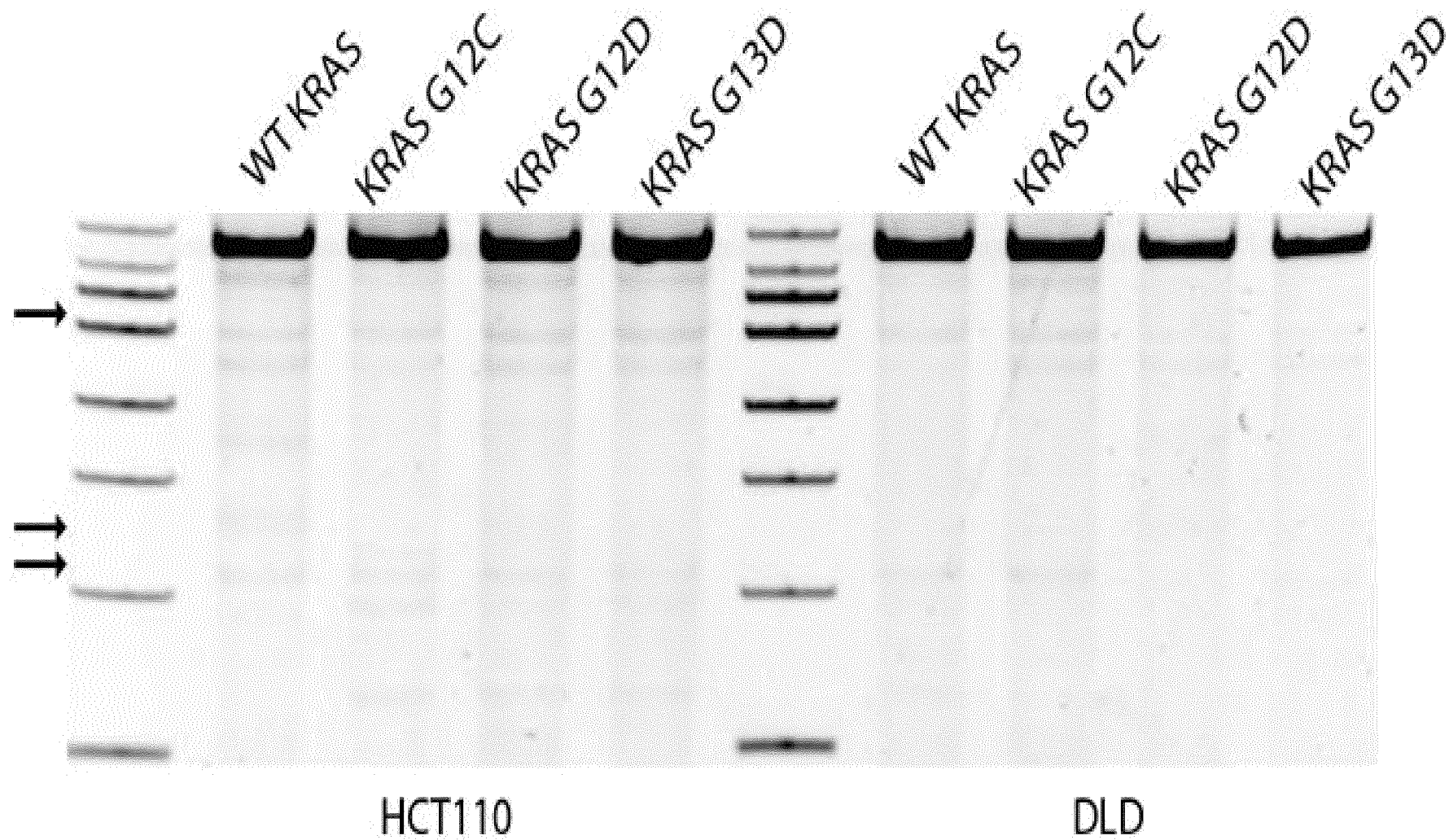


Праймеры показаны зеленым
Сайт-мишень SpCas9 показан синим
Сайт-мишень SaCas9 показан красным

ФИГ.4В

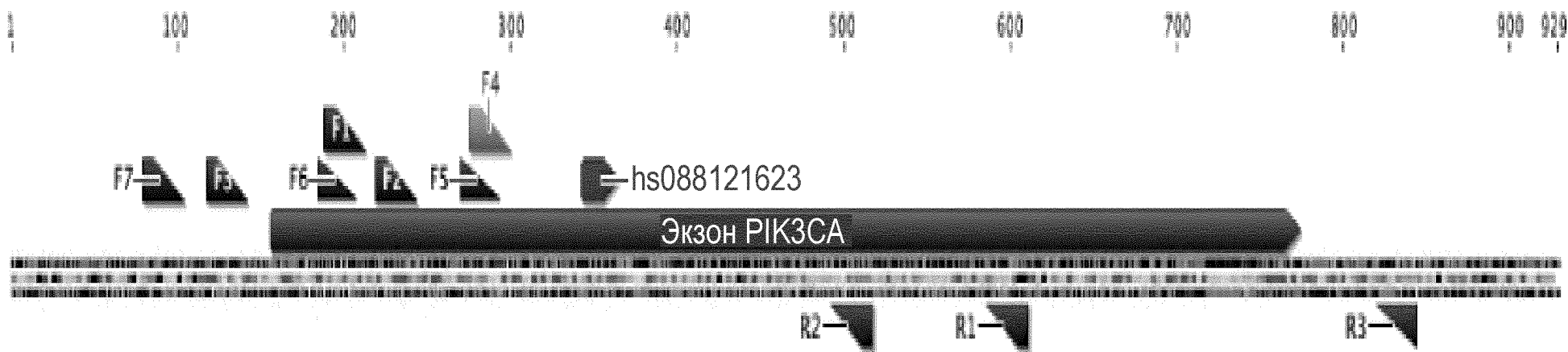


ФИГ.4С



ФИГ.5А

PIK3CA_H1047

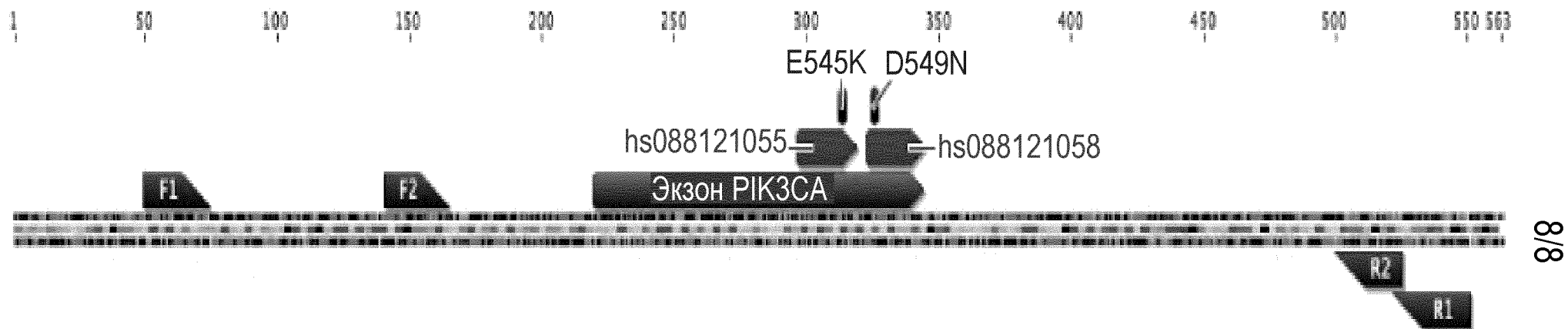


7/8

Праймеры показаны зеленым
Сайт-мишень SpCas9 показан синим
Сайт-мишень SaCas9 показан красным

ФИГ.5В

PIK3CA_ E545K и D549N



8/8

Праймеры показаны зеленым
Сайт-мишень SpCas9 показан синим
Сайт-мишень SaCas9 показан красным