

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991690** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(51) Int. Cl. **C12N 7/00** (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.01.23

**(54) ИНГИБИРОВАНИЕ ЭНДОГЕННОЙ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ И
ТАРГЕТИРОВАНИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ РАКА И
СТАРЕНИЯ**

(31) **62/449,380**

(32) **2017.01.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/014806**

(87) **WO 2018/136920 2018.07.26**

(71) Заявитель:
ХЕЛТ РИСЕРЧ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Гудков Андрей, Леонова Катерина
(US)**

(74) Представитель:
**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)**

(57) Предложены подходы к противораковому и противовозрастному лечению путем введения ингибиторов активности обратной транскриптазы (RT), которые выполняют функцию ингибирования RT, кодируемой ORF2 LINE1, или любой RT, которая может участвовать в активации транскрипции ретрозлементов. Также предложены подходы к открытию новых соединений, которые могут ингибировать RT. Эти способы применимы для использования в популяциях раковых клеток, предраковых клеток и соматических клеток. Предложены способы мониторинга эффективности лечения, при котором ингибируется развитие устойчивости к фармацевтическим агентам, способы профилактики и/или терапии патологии, коррелирующей с накоплением соматических клеток, способных к спонтанной генерации генетических изменений независимо от клеточных делений. Предложены способы лечения и/или предотвращения возрастных состояний у индивидуума путем введения агента, способного избирательно уничтожать клетки, которые проявляют генетическую нестабильность. Предложены способы сенсibilизации раковых клеток к химиотерапевтическому агенту путем введения ингибитора RT.

A1

201991690

201991690

A1

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭНДОГЕННОЙ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ И ТАРГЕТИРОВАНИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ РАКА И СТАРЕНИЯ

Перекрестная ссылка на связанные заявки

Настоящая заявка притязает на приоритет предварительной заявки США № 62/449,380, поданной 23 января 2017 г., раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники

Основной проблемой лечения рака является пластичность и адаптивность опухоли, приводящая к приобретению злокачественных свойств и устойчивости к лечению. Лечение рака традиционно было сосредоточено на фенотипических различиях между опухолевыми и нормальными клетками, таких как неограниченный рост, измененный метаболизм, усиленный ангиогенез, устойчивость к иммунному надзору и метастатическая способность. Все опухолеспецифические признаки возникают из-за высокого уровня нестабильности генома в опухолевых клетках, который генерирует почти бесконечное количество измененных вариантов для естественного отбора. Несмотря на то, что геномная нестабильность является основной движущей силой развития и прогрессирования опухоли, она никогда не рассматривалась как сама цель лечения, поскольку всегда считалась следствием дефектов основных биологических путей (репарация ДНК, контроль репликации, механизм, ограничивающий пролиферацию поврежденных клеток и т. д.), не имеющих мишеней, поддающихся воздействию лекарственных средств. Таким образом, существует постоянная и неудовлетворенная потребность в изменении подхода к лечению рака и других нежелательных последствий, связанных с нестабильностью генома. Настоящее изобретение имеет отношение к этой и другим потребностям.

Краткое описание изобретения

Раскрываемые здесь сведения относятся к новому подходу к противораковому и антивозрастному лечению, вариант осуществления которого в общих чертах приведен на фигуре 1. Варианты осуществления раскрытого здесь включают способы профилактики и/или лечения различных видов рака и других связанных с возрастом состояний. Способы включают введение ингибиторов активности обратной транскриптазы (RT) для того, чтобы среди прочих эффектов улучшить результаты в тех случаях, когда обычные противораковые средства (не являющиеся ингибиторами обратной транскриптазы) являются недостаточными, или являются менее эффективными, когда ингибитор RT не вводят. В вариантах осуществления ингибиторы RT функционируют так, чтобы ингибировать RT, кодируемую ORF2 LINE1, или любую RT, которая может участвовать в активации транскрипции ретроэлементов. Раскрываемые сведения также включают подходы к обнаружению новых соединений, а также выявление индивидуумов, которые получают пользу от лечения такими ингибиторами RT, чтобы, например, улучшить противораковые и другие терапевтические подходы путем комбинирования ингибиторов RT с другими фармакологическими агентами и/или другими медицинскими вмешательствами, как это дополнительно описано ниже.

В одном подходе изобретение обеспечивает способ снижения генетической нестабильности в популяции эукариотических клеток, включающий введение в клетки ингибитора RT с тем, чтобы ингибировать активность RT, кодируемой ORF2 LINE1 (где RT обозначается как RT^{LINE}), в клетках, и вследствие чего клетки проявляют сниженную генетическую нестабильность после введения. Генетическая нестабильность включает, не обязательно ограничиваясь этим, хромосомные инсерции, амплификации/делеции и точечные мутации, которые по меньшей мере частично обусловлены RT^{LINE}, которая, как полагают, не

экспрессируется в нормальных клетках. Таким образом, раскрытие включает подавление геномной нестабильности в популяциях соматических клеток путем либо ингибирования активности RT^{LINE} лекарственными средствами, либо стимулирования иммунной системы, чтобы уничтожить клетки с активированными функциональными элементами LINE. Соответственно, раскрытые здесь сведения имеют отношение к использованию в популяции раковых клеток, предраковых клеток, соматических клеток, а также их комбинаций. В определенных аспектах ингибитор RT может быть введен в потомство популяции клеток, тем самым получая потомство популяции клеток, которое обладает сниженной генетической нестабильностью. В определенных воплощениях использование ингибитора RT, как описано в настоящем документе, приводит по меньшей мере к одному из следующего: меньшему количеству точечных мутаций, меньшему количеству хромосомных инсерций, меньшему количеству хромосомных делеций, меньшему количеству амплификаций, уменьшению способности к метастазированию, уменьшению способности к иммортализации или уменьшению развития устойчивости к одному или нескольким фармацевтическим агентам, где генетическая нестабильность снижена относительно контроля. Такие эффекты могут быть реализованы в популяциях клеток. Любой подходящий контроль для измерения таких эффектов может быть использован, и такие контроли будут очевидны для специалистов в данной области техники с учетом преимуществ раскрытого здесь. В неограничивающих вариантах осуществления контроль включает величину генетической нестабильности, найденную для клеток, в которых активность RT не ингибируется.

В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к подавлению точечных мутаций, которые вызваны по меньшей мере частично эндонуклеазной активностью интегразного компонента RT; и/или к инсерциям, которые включают интеграцию новых копий одного или нескольких повторяющихся элементов, или интеграцию новых псевдогенов, или комбинацию указанного; и/или к делециям, которые включают потерю сегмента хромосомы, который окружен интегрированными копиями повторяющихся элементов; и/или генетическим амплификациям, которые включают новые копии фрагментов генома, которые содержат один или несколько функциональных генов, окруженных вновь интегрированными копиями повторяющихся элементов. В вариантах осуществления раскрытие относится к введению RT в популяцию клеток, так что по меньшей мере некоторые клетки в популяции клеток и/или потомство указанных клеток проявляют по меньшей мере одно из следующего: i) меньшую устойчивость к фармацевтическому агенту, и/или ii) сниженную метастатическую способность, или iii) меньше признаков старения, по сравнению с контролем.

Раскрытые здесь способы могут быть осуществлены в отношении популяции клеток, которые поддерживаются *in vitro* или присутствуют в многоклеточном организме и, следовательно, включают клетки млекопитающих, включая, но не обязательно, клетки человека. В вариантах осуществления популяция клеток входит в состав солидной опухоли или представляет собой раковые клетки крови.

В некоторых воплощениях популяция клеток не заражена вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) или другими ретровирусами, и клетки в популяции не включают интегрированный провирус ВИЧ или другой интегрированный провирус ретровирусного происхождения.

В неограничивающем варианте осуществления популяция клеток включает раковые клетки в индивидууме, и введение ингибитора RT выполняют на протяжении периода времени, в течение которого: i) раковые клетки не развивают устойчивость к химиотерапевтическому агенту, который также вводят индивидууму в течение этого периода времени, и/или ii) раковые клетки развивают меньшую, по сравнению с контролем,

устойчивость к химиотерапевтическому агенту, который также вводят индивидууму в течение этого периода времени.

В другом неограничивающем варианте, популяция клеток включает соматические клетки в индивидууме, и введение ингибитора RT выполняют на протяжении периода времени, в течение которого индекс дряхлости индивидуума улучшается, или ухудшение индекса дряхлости индивидуума замедляется относительно контроля.

В другом аспекте раскрытие предоставляет способ определения того, является ли тестируемый агент(ы) кандидатом для применения в качестве ингибитора RT, причем способ включает:

- i) приведение клеток, которые экспрессируют RT, кодируемую ORF2 LINE1 (RT^{LINE}), в контакт с одним или несколькими тестируемыми агентами;
- ii) тестирование на изменение генетической нестабильности в клетках; и
- iii) установление того, что тестируемый агент является кандидатом, путем определения сниженной генетической нестабильности в клетках и/или их потомстве относительно контроля; или
- iii) установление того, что тестируемый агент не является кандидатом, путем определения отсутствия снижения генетической нестабильности или её увеличения в клетках и/или их потомстве по сравнению с контролем. Этот аспект может дополнительно включать приведение клеток в контакт с химиотерапевтическим агентом для определения того, подавляет ли ингибитор RT развитие устойчивости к химиотерапевтическому агенту. Такие измерения могут быть выполнены с использованием любого подходящего подхода, такого как измерение изменения генетической нестабильности, определяемого с использованием обнаруживаемого репортера, при котором обнаруживаемый репортер указывает на ответ на повреждение ДНК.

В одном аспекте раскрытия предлагается способ уменьшения количества/уничтожения клеток, которые проявляют генетическую нестабильность. Способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей один или несколько агентов, которые способны избирательно уничтожать клетки, которые проявляют генетическую нестабильность, при этом клетки, которые проявляют генетическую нестабильность, могут быть идентифицированы по экспрессии функциональных LINE1. В определенных реализациях этого подхода один или несколько агентов включают, полностью или в виде сегмента, один или два белка, кодируемых элементами LINE1 (ORF1 и ORF2), или один или несколько агентов включают вектор(ы) экспрессии, кодирующий указанные один или два белка или их сегмент(ы), при этом белок (белки) или их сегмент(ы) могут стимулировать иммунный ответ против клеток, которые проявляют генетическую нестабильность. В одном варианте осуществления композиция, вводимая индивидууму, дополнительно содержит один или несколько иммуноадьювантов и/или иммуномодуляторов, и/или вектор(ы) экспрессии кодирует один или несколько иммуноадьювантов и/или иммуномодуляторов.

В любых из воплощений настоящего изобретения ингибитор RT может быть нуклеозидным ингибитором RT, или нуклеотидным ингибитором RT, или их комбинацией. Неограничивающие примеры подходящих ингибиторов RT включают ставудин и ламивудин, а дополнительные примеры подходящих ингибиторов RT описаны ниже.

В другом аспекте раскрытие включает способ идентификации стимула, который вызывает генетическую нестабильность. Этот подход включает воздействие тестируемым стимулом на эукариотические клетки и

тестирования клеток на увеличение активности RT, кодируемой ORF2 LINE1 (RT^{LINE}), при этом увеличение активности RT указывает на то, что стимул вызывает генетическую нестабильность.

В другом аспекте раскрытие относится к способу идентификации индивидуума в качестве кандидата для лечения ингибитором RT, где RT кодируется ORF2 LINE1 (RT^{LINE}), и/или для лечения вакциной, которая стимулирует экспрессию иммунного ответа против клеток, которые проявляют генетическую нестабильность, которая может быть идентифицирована по экспрессии функционального LINE1. Эти подходы включают тестирование образца, полученного от индивидуума, для определения меры генетической нестабильности, и сравнение меры генетической нестабильности с контролем, при этом более высокая генетическая нестабильность по сравнению с контролем указывает на то, что индивидуум является кандидатом для лечения. В этом и других воплощениях согласно настоящему раскрытию мера генетической нестабильности включает характеристику по меньшей мере одного из следующего: точечных мутаций, хромосомных инсерций, хромосомных делеций, генных амплификаций, метастатической способности клеток индивидуума, способности клеток индивидуума к иммортализации, экспрессии и/или присутствия повторов ДНК LINE1 в клетках индивидуума, а также комбинации таких мер. В одном варианте осуществления раскрытие включает идентификацию индивидуума в качестве кандидата для лечения ингибитором RT или получение результата теста с такой идентификацией и введение индивидууму ингибитора RT и/или вакцины.

В другом аспекте раскрытие включает способ мониторинга эффективности лечения, направленного на подавление развития устойчивости к лечению фармацевтическим агентом. Этот способ включает тестирование образца клеток от индивидуума для определения меры генетической нестабильности в первый момент времени в процессе лечения и сравнение этой меры с контролем, при этом отсутствие увеличения генетической нестабильности по сравнению с контролем указывает на достаточную эффективность лечения. С другой стороны, увеличение генетической нестабильности в первый момент времени указывает на недостаточную эффективность лечения. Таким образом, раскрытие включает корректировку дозировки лечения и тестирование второго образца клеток от индивидуума для определения меры генетической нестабильности для установления того, была ли корректировка дозировки достаточной для подавления развития устойчивости. Такие подходы применимы, например, для определения эффективности лечения рака, при котором агент представляет собой химиотерапевтический агент или вакцину.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу профилактики и/или терапии патологии, коррелирующей с накоплением соматических клеток, способных к самопроизвольной генерации генетических изменений независимо от клеточных делений, где такие клетки могут характеризоваться экспрессией функциональных элементов LINE1. Этот способ включает введение индивидууму одного или нескольких ингибиторов RT с тем, чтобы ингибировать активность RT, кодируемой ORF2 LINE1 (RT^{LINE}), в соматических клетках, и/или введение индивидууму вакцины с тем, чтобы стимулировать иммунологический ответ на соматические клетки. В некоторых реализациях этого подхода патология включает рак или другие пролиферативные расстройства, такие как миелодиспластический синдром или доброкачественные опухоли, или aberrантную иммуномодуляцию, такую как индукция и/или обострение воспаления, которое может инициировать или ускорять старение и/или злокачественную трансформацию соматических клеток. В вариантах осуществления патология включает спонтанное старение и/или одно или несколько состояний, связанных со старением и/или спонтанным старением. В вариантах осуществления изменение в патологии может быть обнаружено путем определения изменения индекса дряхлости у

индивидуума. Например, изменение индекса дряхлости может быть измерено в различные моменты времени для оценки эффективности метода.

В другом аспекте раскрытие включает способ лечения и/или предотвращения возрастных состояний у индивидуума путем введения индивидууму, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей один или несколько агентов, которые способны избирательно уничтожать клетки, которые проявляют генетическую нестабильность, причём клетки, которые проявляют генетическую нестабильность, могут быть идентифицированы по экспрессии функциональных LINE1. Один или несколько агентов могут включать один или два белка, полностью или в виде сегмента, кодируемых элементами LINE1 (ORF1 и ORF2), или один или несколько агентов включают вектор(ы) экспрессии, кодирующий указанные один или два белка или их сегмент(ы), при этом белок (белки) или его сегмент(ы) могут стимулировать иммунный ответ против клеток, которые проявляют генетическую нестабильность. В вариантах осуществления композиция, содержащая один или несколько агентов, дополнительно содержит один или несколько иммуноадаьювантов и/или иммуномодуляторов, и/или вектор(ы) экспрессии кодирует один или несколько иммуноадаьювантов и/или иммуномодуляторов, и может альтернативно или дополнительно содержать нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы или нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы.

В другом аспекте раскрытие относится к способу сенсibilизации раковых клеток к химиотерапевтическому агенту. Этот способ включает введение в раковые клетки химиотерапевтического агента и ингибитора RT, при этом раковые клетки не инфицированы ВИЧ или другим ретровирусом, и раковые клетки не содержат интегрированный провирус ВИЧ или другой интегрированный провирус ретровирусного происхождения.

Краткое описание графических материалов

На Фигуре 1 представлено схематическое описание новой парадигмы методов противоракового и противовозрастного лечения, основанного на фармакологическом и иммунотерапевтическом нацеливании на клетки, экспрессирующие обратную транскриптазу, кодируемую семейством элементов LINE1 (LINE1 RT).

Фигура 2 показывает процедурную схему анализа ретротранспозиции LINE1, как описано в Moran et al. Cell. 1996 87(5):917-27 (показано в рамке слева). Для анализов на чашках клетки HeLa трансфицировали репортерной плазмидой; появление неорезистентных колоний указывает на события ретротранспозиции; изображения чашек сверху показывают, что ставудин эффективен при концентрациях выше 5 мМ. Нижняя панель демонстрирует отсутствие влияния указанных концентраций ставудина на клоногенность клеток HeLa.

На Фигуре 3 представлена графическая сводка (левая панель) и графические результаты анализов на чашках (правая панель), полученные при использовании типичных ингибиторов RT: ставудина (STV) и азидотимидина (AZT); и демонстрирует подавление приобретения лекарственноустойчивых клеточных вариантов в популяции клеток колоректального рака HCT116.

На Фигуре 4 представлена графическая сводка результатов, демонстрирующих, что типичный ингибитор RT ВИЧ ставудин продлевает безопухолевую выживаемость самцов мышей C57BL6/j с выключенным p53.

Фигура 5 представляет графическое обобщение результатов, демонстрирующих, что типичный ингибитор RT ставудин задерживает возникновение и снижает частоту рецидивов опухоли после первоначального ответа на стандартную химиотерапию в модели спонтанной нейробластомы у мышей.

Описание изобретения

Если не определено иначе в данном документе, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится это раскрытие.

Если не указано иное, предполагается, что каждое максимальное числовое ограничение, приведенное в этом описании, включает каждое более низкое числовое ограничение, как если бы такие более низкие числовые ограничения были прямо указаны здесь. Каждое минимальное числовое ограничение, приведенное в этом описании, будет включать каждое более высокое числовое ограничение, как если бы такие более высокие числовые ограничения были прямо указаны здесь. Каждый числовой диапазон, приведенный в этом описании, будет включать каждый более узкий числовой диапазон, попадающий в такой более широкий числовой диапазон, как если бы такие более узкие числовые диапазоны были все прямо указаны в данном документе.

Настоящее раскрытие в целом связано с идеей о том, что транскрипционная активация ретроэлементов может происходить либо самопроизвольно, либо после специфических стрессов (т. е. генотоксических условий) в редких соматических клетках организмов млекопитающих. Неограничивающий вариант осуществления этого раскрытия схематически представлен на Фигуре 1 и дополнительно обсуждается в Примерах. Более подробно, и без намерения быть ограниченным какой-либо конкретной теорией, считается, что этот «десайленсинг» приводит к экспрессии эндогенной обратной транскриптазы (RT), кодируемой элементами LINE1, которая стимулирует синтез копий кДНК различных РНК (т. е. РНК LINE1, РНК элементов SINE, белок-кодирующие мРНК, тРНК, малые ядерные РНК и т. д.) и интеграцию в случайные участки клеточной ДНК. Это приводит к инсерционному мутагенезу, связанному с инактивацией генов или синтезом aberrantных продуктов (интеграция в открытые рамки считывания), модуляцией экспрессии (интеграция в регуляторные области), амплификацией генов (когда сходные повторы интегрируются вокруг определенного гена, облегчая гомологичную рекомбинацию) и т. д. Более того, RT LINE1 образует разрывы ДНК благодаря своей эндонуклеазной активности, вызывая тем самым точечные мутации. Этот процесс приводит к высокой степени нестабильности генома в популяциях соматических клеток, что приводит к повышенному риску развития рака и накопления клеток с измененными свойствами и нарушением нормальных функций, способствуя тем самым общему снижению функциональных показателей организма, наблюдаемому с возрастом. Поскольку все эти процессы зависят по меньшей мере частично от эндогенного RT элементов LINE1, настоящее раскрытие частично основано на подходе, согласно которому их можно ингибировать и/или предотвращать с помощью нацеливания на RT и/или клетки, которые экспрессируют эту RT. Таким образом, в различных вариантах осуществления раскрытие относится к ингибированию и/или предотвращению рака, старения и связанных с возрастом заболеваний и для подавления прогрессирования рака. Соответственно, в вариантах осуществления раскрытие включает способы снижения появления генетически измененных клеток, таких как клетки с повышенной нестабильностью генома, фенотипической пластичностью и адаптивностью, и другими функциями, которые описаны здесь более подробно. В варианте осуществления раскрытие относится к уменьшению количества таких генетически измененных клеток в популяции клеток, таких как раковые клетки. В общем, способы согласно раскрытию включают воздействие на такие клетки одним или несколькими ингибиторами RT и/или вакцинацию против таких клеток.

Раскрытие в определенных подходах включает способы ингибирования развития генетически измененных вариантов из генетически измененных клеток в популяции раковых клеток, где клетки ранее приобрели

высокую степень геномной нестабильности, такие как клетки, которые экспрессируют функциональные LINE1 ДНК повторы. Раскрытие в некоторых аспектах включает нацеливание на генетически измененные клетки ингибиторами RT и/или вакцинами или другими иммуномодулирующими агентами, которые селективно нацеливаются на генетически измененные клетки.

В вариантах осуществления «генетически измененные клетки» включают в себя клетки, которые приобрели по меньшей мере одно из следующего: точечные мутации, инсерции, делеции и амплификации, по меньшей мере частично из-за активности RT. Генетически измененные клетки могут включать клетки, которые приобрели новые процессированные псевдогены, и клетки, которые, вследствие их генетической модификации, приобретают устойчивость к лечению рака или приобретают другие свойства, которые придают селективные преимущества для таких клеток. Генетически измененные клетки включают, не обязательно ограничиваясь этим, клетки меланомы, нейробластомы или других видов рака, которые приобрели амплификацию протоонкогенов, например, генов семейства MYC (т. е. CMYC, NMYC), и рака молочной железы, яичников или простаты, которые приобрели амплифицированные гены HER2/NEU, и клетки рака простаты, которые приобрели амплификацию или точечные мутации в гене рецептора андрогена и, таким образом, стали кастрационнорезистентными, а также другие примеры лечения устойчивости раковых клеток. Генетически измененные клетки включают клетки с хромосомными аномалиями, которые отличают их от других клеток в популяции, включая клетки с хромотрисомией и т. д. В некоторых аспектах раскрытие относится к клеткам, которые развили устойчивость к одному или нескольким видам лечения рака, что означает, что клетки обладают способностью продолжать пролиферацию в присутствии химиотерапевтического препарата(ов), нацеленного противоракового агента (агентов), продолжающийся иммунотерапии или радиационного лечения, к которым клетки развили устойчивость. В вариантах осуществления этого раскрытия развитие такой устойчивости ингибируется и/или предотвращается введением агента, ингибирующего RT, как описано здесь.

Любой ингибитор обратной транскриптазы может быть использован в способах согласно раскрытию. Таким образом, использован может быть любой фармацевтический агент(ы), который обладает ингибирующей активностью в отношении полимеразной и/или эндонуклеазной активности в отношении обратной транскриптазы, кодируемой элементами LINE. В вариантах осуществления RT кодируется ORF2 LINE1 или кодируется ORF2 элементов LINE2, которые присутствуют в геномах млекопитающих. Подходящие ингибиторы RT включают, не ограничиваясь этим, те ингибиторы RT ВИЧ, которые обладают перекрестной реактивностью с RT, кодируемой ORF2 LINE1 (т. е. ставудин). Подходящие агенты также включают ингибиторы интегразы ВИЧ и, соответственно, обладают перекрестной реактивностью с эндонуклеазной активностью RT, кодируемой ORF2 LINE1. В определенных подходах ингибитор RT может быть нуклеозидным или нуклеотидным ингибитором RT, или ненуклеозидным или ненуклеотидным ингибитором RT. В вариантах осуществления ингибитор RT может включать соединение или комплекс соединений, обладающих двойным ингибирующим действием в отношении RT и интегразы. Таким образом, в различных вариантах осуществления раскрытие включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, одного или более соединений, которые функционируют как нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI или NRTI) или нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (NtARTI или NtRTI). Неограничивающие примеры таких соединений включают AZT (Зидовудин), Диданозин, Зальцитабин, Ставудин, Ламивудин, Абакавир, Эмтрицитабин, Энтекавир, Тенофовир, Адефовир, зальцитабин (ddC), ламивудин (3TC), и эмтрицитабин (FTC), абакавир (ABC) и энтекавир (ETV), диданозин (ddI), тенофовир

(TDF) и адефовир (ADV). В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI), неограничивающие примеры которых включают Эфавиренц, Невирапин, Делавирдин, Этравирин и Рилпивириин. В одном варианте осуществления раскрытие включает введение ингибитора Портманто.

В дополнении к тому, что охватывается использование любого известного ингибитора RT, раскрытие включает способы идентификации новых ингибиторов эндонуклеазной активности RT LINE1, включающие отбор агентов-кандидатов по их способности ингибировать RT, и/или по их способности блокировать ответ на повреждение ДНК, такой как в экспериментально полученных клетках в культуре, несущей репортер любого типа, свидетельствующий об ответе на повреждение ДНК (т. е. репортеры, отвечающие на p53).

В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к фармакологическому и иммунотерапевтическому подходам к ингибированию и/или предотвращению патологических последствий, возникающих в результате накопления в нормальных популяциях соматических клеток тела млекопитающих вариантов, способных к спонтанной генерации генетических изменений независимо от клеточных делений. Общим свойством таких клеток является экспрессия функциональных элементов LINE1. Такие патологические последствия могут включать рак, другие пролиферативные расстройства (т. е. миелодиспластический синдром, доброкачественные опухоли) и иммуномодуляцию (т. е. индукцию воспаления), которые могут способствовать старению и злокачественной трансформации. Патологические последствия, на борьбу с которыми направлены варианты осуществления этого раскрытия, также включают естественную дряхлость пожилых людей и животных, не являющихся людьми, которая возникает в результате самопроизвольного старения. Таким образом, эффективность лечения может быть определена в одном аспекте путем измерения индекса дряхлости индивидуума. Определение индекса дряхлости (FI) может быть выполнено в соответствии с известными подходами. В некоторых вариантах осуществления индекс дряхлости может быть рассчитан на основе ряда параметров, включая отношение общего количества недостатков, которые измерены и которым присвоен балл FI, такой как балл FI между 0 (нет недостатков = в хорошей форме) и 1 (все недостатки присутствуют = дряхлый). Следовательно, например, более высокий FI указывает на плохое состояние здоровья организма и/или биологический возраст организма. В целом, без намерения ограничиться какой-либо теорией, считается, что дряхлость - это состояние повышенной уязвимости к неблагоприятным последствиям. Индекс FI согласно данному раскрытию может включать измерение любого подходящего количества накопленных недостатков, например от 5 до 30 недостатков. В вариантах осуществления может быть использован индекс дряхлости, описанный в публикации Searle et al., (2008) DOI: 10.1186/1471-2318-8-24, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В вариантах осуществления индекс дряхлости рассчитывают, как описано в патентной публикации США № 20150285823, из которой описание индекса дряхлости, параметры индекса дряхлости и определение индекса дряхлости включены в настоящий документ посредством ссылки. Параметры индекса дряхлости могут включать, не ограничиваясь этим, вес, силу захвата, артериальное давление, общий анализ крови и анализ цитокинов.

Способы введения композиций согласно раскрытию, включая ингибиторы RT и иммуногенные композиции, могут включать парентеральное, внутрибрюшинное, внутрилегочное, пероральное, мукозальное и местное введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное и подкожное введение. Количество ингибитора RT и/или иммуногенного агента (или кодирующего его полинуклеотида) и любого другого активного агента, включаемого в композицию и/или

используемого в способе, может определить специалист в данной области с учетом преимуществ настоящего раскрытия. Таким образом, в одном варианте осуществления вводится эффективное количество композиции по изобретению. Эффективное количество может быть количеством, которое ослабляет симптомы заболевания, связанные с раком, старением и/или возрастными заболеваниями. Для иммуногенных композиций эффективное количество таково, что в результате вакцинации по меньшей мере некоторые клетки, которые экспрессируют RT и/или обладают генетической нестабильностью, как описано в настоящем документе, устраняются из индивидуума. Эффективными количествами ингибиторов RT являются те, которые ингибируют функцию RT, чтобы уменьшить или устранить возникновение генетической нестабильности, которая описана здесь.

В определенных вариантах осуществления композицию, содержащую вакцину и/или ингибитор RT, вводят индивидууму, нуждающемуся в этом. У индивидуума может быть диагностирован или подозреваться любой рак и/или любое возрастное состояние или может иметься риск их развития. В некоторых вариантах осуществления раскрытие относится к профилактике и/или терапии возрастных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, диабет типа II, дегенерация желтого пятна, патологии на основе хронического воспаления (например, артрит), и/или предотвращению развития типов рака, для которых известно, что они связаны со старением (например, рак предстательной железы, меланома, рак легкого, рак толстой кишки и т. д.) и/или имеет целью улучшение результата лечения рака с помощью лучевой или химиотерапии. В определенных вариантах осуществления индивидуум, которого лечат с использованием подхода согласно этому раскрытию, выбран, основываясь по меньшей мере частично на наличии клеток, обладающих генетической нестабильностью, при этом генетическая нестабильность является такой, как дополнительно описано в данном документе. В вариантах осуществления индивидуум не имеет и/или не заразился ретровирусной инфекцией. В вариантах осуществления индивидуум не является ВИЧ+ и не был диагностирован как ВИЧ+. В вариантах осуществления индивидуум характеризуется как имеющий низкий риск заражения ВИЧ-инфекцией или другой ретровирусной инфекцией. В вариантах осуществления индивидуума выбирают для лечения согласно настоящему изобретению на основании определения индекса дряхлости и/или путем определения одного или нескольких параметров, описанных в настоящем документе, которые указывают на нестабильность генома. В вариантах осуществления индивидуум не получал ингибитор RT перед первым лечением ингибитором RT, как описано здесь.

Эффективное количество композиции, вводимой в соответствии с этим раскрытием, может варьироваться в зависимости от способов изготовления фармацевтической композиции, способов введения, фактического или рассчитанного возраста пациента, массы тела, пола, общего состояния здоровья, типа и стадии рака, если лечат рак, диеты, времени введения, пути введения и других факторов, которые будут очевидны для специалистов в данной области. Композиции можно вводить один раз или сериями введений, и их можно вводить длительно, чтобы поддерживать геномную стабильность и/или улучшать геномную стабильность. Таким образом, в вариантах осуществления раскрытие включает введение ингибитора(ов) RT в течение длительного периода времени, и, следовательно, может включать постоянное введение эффективных доз фармакологических агентов, способных подавлять полимеразную и/или эндонуклеазную функцию RT LINE1. Иммунотерапевтические способы, как описано выше, включают содействие избирательному уничтожению клеток, которые экспрессируют функциональные LINE1, и, таким образом, включают методы вакцинации. Вакцины согласно настоящему раскрытию могут включать композиции, которые содержат один или оба белка, кодируемых элементами LINE1 (ORF1 и ORF2), и могут содержать их иммуногенные

фрагменты. Белки могут быть скомбинированы с любым подходящим иммуноадьювантом (иммуноадьювантами), включая, не ограничиваясь этим, квасцы и/или агонисты рецепторов врожденного иммунитета, и могут быть связаны с такими композициями, включая нековалентные и ковалентные связи. В другом подходе стимуляция иммунного ответа может быть достигнута с использованием любого подходящего рекомбинантного вектора(ов), кодирующего один или оба белка LINE1 и/или их иммуногенные фрагменты. Подходящие рекомбинантные векторы включают, не ограничиваясь этим, аденовирусные, лентивирусные и аденоассоциированные вирусные векторы. Такие векторы могут также экспрессировать иммуномодуляторы (т. е. бактериальный флагеллин) в качестве иммуноадьювантов. В некоторых вариантах осуществления клетки, которые являются мишенью, и количество которых снижают или которые устраняют из популяций соматических клеток стимулированной иммунной системой согласно этому раскрытию, включают клетки, которые экспрессируют LINE1, или клетки, которые приобрели новые процессированные псевдогены или имеют хромосомные аномалии.

Более подробно, и без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, считается, что, несмотря на то, что геномная нестабильность является такой фундаментальной движущей силой развития и прогрессирования опухоли, она ранее не рассматривалась как сама цель лечения, так как она рассматривалась как следствие дефекта в основных путях (репарация ДНК, контроль репликации, механизм, ограничивающий пролиферацию поврежденных клеток и т. д.) без «поддающихся лечению» мишеней. Настоящее раскрытие представляет альтернативную парадигму, основанную на том объяснении, что геномная нестабильность опухолевых клеток вызвана активным процессом, включающим десайленсинг и управляемую обратной транскриптазой амплификацию повторяющихся ретроэлементов, которые составляют (в норме в молчащей форме) почти половину генома млекопитающих. Этот процесс обусловлен эндогенной обратной транскриптазой (RT), кодируемой редкими копиями повторов, принадлежащих семейству LINE (RT^{LINE}), которые сохраняют свои функциональные возможности. Раскрытие частично относится к наблюдению, что транскрипционный десайленсинг ретроэлементов часто происходит при раке и может быть спровоцирован потерей p53, который в норме действует как эпигенетический репрессор «ДНК-рипитома». Кроме того, опухоли часто приобретают активацию экспрессии эндогенной RT^{LINE} , которая не наблюдается в нормальных клетках, кроме как в раннем эмбриогенезе и в мозге новорожденных. Таким образом, опухоли часто приобретают все необходимые компоненты для «генератора геномной нестабильности» (RT, а также матрицы РНК для амплификации), который может производить три типа мутаций: инсерции (интеграция новых копий повторов и новых процессированных псевдогенов), амплификации/делеции (спровоцированные гомологичной рекомбинацией между вновь интегрированными копиями повторов) и точечные мутации (посредством эндонуклеазной активности интегразы RT^{LINE}). Поскольку считается, что все эти события обусловлены одним ферментом - RT^{LINE} , - который не экспрессируется в нормальных клетках, раскрытие относится к подавлению геномной нестабильности в популяциях соматических клеток путем либо подавления активности RT^{LINE} с помощью лекарственных средств, либо стимулирования иммунной системы на уничтожение клеток с активированными функциональными элементами LINE. В связи с этим авторы изобретения демонстрируют, что ставудин, лекарственное средство, используемое для лечения ВИЧ и способное ингибировать активность RT^{LINE} , значительно снижает частоту амплификации генов *in vitro* и значительно увеличивает продолжительность безопухолевой жизни склонных к опухолям мышей с дефицитом p53. Таким образом, настоящее раскрытие относится к объяснению того, что: (i) активация ретроэлементов под действием RT^{LINE} является основным фактором, способствующим нестабильности генома, лежащей в основе развития и прогрессирования рака, и

(ii) эрадикацию клеток с активированной RT^{LINE} посредством иммунотерапии (вакцинации) можно использовать для предотвращения рака, а также других особенностей, которые будут очевидны для специалистов в данной области техники из этого раскрытия. В определенных аспектах раскрытие включает вакцины против антигенов клеток, экспрессирующих LINE1, которые тестируют для предотвращения приживления, и лечение трансплантированных опухолей, экспрессирующих LINE1 мыши. Успешные вакцины могут продемонстрировать эффективность профилактики рака на четырех моделях склонных к раку мышей, генетически предрасположенных к раку молочной железы (MMTV-neu), простаты (PTEN гомизиготные) или множественным ракам (дефицитные по p53, p53 гомизиготные + облученные).

Как обсуждалось выше, в определенных вариантах осуществления раскрытие включает клетки-мишени, которые содержат/экспрессируют ДНК-ретроэлементы. Эти элементы, а именно короткие и длинные диспергированные повторы (SINE и LINE), вместе составляют почти 40 % большинства геномов млекопитающих. Более 65 миллионов лет назад все основные классы SINE и LINE массово проникли в геномы предшественников млекопитающих с помощью механизма, напоминающего естественную ПЦР, управляемую обратной транскриптазой (RT). Источником фермента RT являются элементы LINE1 древних примитивных РНК-вирусов, которые имеют только две открытые рамки считывания (ORF), одна из которых, ORF2, кодирует RT. Массивная амплификация SINE и LINE совпала на эволюционной шкале с появлением всех основных архетипов млекопитающих, предположительно обеспечивая естественный отбор с огромным генетическим и фенотипическим разнообразием благодаря инсерционному мутагенезу. В геномах современных млекопитающих амплификация SINE и LINE эффективно блокируется, поскольку они транскрипционно молчат, не образуя ни RT, ни матрицы РНК, доступные для ретротранспозиций. Авторы изобретения показали, что эпигенетический сайленсинг ретроэлементов совместно контролируется p53 и метилированием ДНК. Если оба не срабатывают, массивная транскрипция вирусоподобных РНК индуцирует суицидальный ответ на интерферон (Leonova K. I. et al. p53 cooperates with DNA methylation and a suicidal interferon response to maintain epigenetic silencing of repeats and noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, E89-98 (2013)). Тем не менее, все эти меры безопасности не могут полностью предотвратить активность ретроэлементов, что очевидно из анализа опухолей, которые часто приобретают экспрессию RT^{LINE} несколькими оставшимися функциональными элементами среди ~100000 копий LINE, присутствующих в геноме человека или мыши. Опухоли также обычно активируют транскрипцию вирусоподобных РНК, тем самым обеспечивая РНК-матрицы для RT^{LINE} для инициирования процесса амплификации ретроэлементов. Соответственно, появление новых интегрированных копий как SINE, так и LINE было продемонстрировано во многих опухолях, и было показано, что масштаб активации RT коррелирует с этапами прогрессирования опухоли.

Не имея намерения ограничиваться какой-либо конкретной моделью, настоящее раскрытие частично основано на том представлении, что ретроэлементная активность является основным источником нестабильности генома, приводящим к развитию и прогрессированию рака, и является частью активного непрерывного процесса, который, в отличие от других механизмов, вовлеченных в нестабильность генома (например, неточность репликации ДНК, неэффективность репарации ДНК и т. д.), потенциально поддается лечению. В связи с этим считается, что амплификация ретроэлементов полностью зависит от единственного известного эндогенного источника RT, кодируемого несколькими высокоомологичными копиями LINE1. Настоящее раскрытие демонстрирует, что низкомолекулярные ингибиторы эндогенной RT^{LINE} вызывают уменьшение частоты амплификации генов в опухолевых клетках *in vitro* и задержку спонтанного развития

опухоли у мышей с дефицитом p53. Таким образом, это раскрытие указывает на то, что активность RT может существенно влиять на стабильность генома, а ее ингибирование может снижать развитие и прогрессирование рака. Следовательно, это раскрытие представляет стратегию смены парадигмы профилактики рака, а также решения проблем старения и связанных с возрастом заболеваний, при которых пластичность раковых и других клеток рассматривается в качестве поддающейся лечению особенности, и может обеспечить значительное улучшение эффективности современных способов лечения путем подавления развития вариантов опухолевых клеток, устойчивых к лекарствам, а также предотвращения и/или ингибирования спонтанного старения и возрастных заболеваний. Соответственно, в настоящем раскрытии впервые показано, что нестабильность генома - основное свойство рака, делающее его непобедимым, - является особенностью, поддающейся фармакологическому и иммунотерапевтическому (вакцинному) воздействию. Хотя и имеются опубликованные отчеты о противоопухолевой активности ингибирования RT, все они основаны на предположении о том, что RT имеет большое значение для жизнеспособности опухолевых клеток. Напротив, в определенных вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к концепции не нацеливания на жизнеспособность опухоли (и других клеток, вовлеченных в старение и возрастные расстройства), а скорее на их «творческий потенциал» - генетическую и фенотипическую пластичность. Раскрытие, следовательно, определяет новую роль ингибиторов RT в онкологии и старении в качестве лекарственных средств для предотвращения развития и прогрессирования рака, включая приобретение устойчивости к лечению, и связанных с этим подходов и результатов в области старения и возрастных состояний. Кроме того, в дополнение к своей концептуальной новизне настоящее раскрытие включает ряд важных технических новшеств. Например, раскрытие включает зависимый от ретропозиции суицидальный элемент, подходящий как для применения *in vitro*, так и для трансгенных мышей. Также включен ряд новых рационально разработанных рекомбинантных белков для эффективной вакцинации против LINE. Векторы, генетически модифицированные клеточные линии и трансгенные мыши, полученные в результате этого раскрытия (т. е. клеточные линии и мыши с активными RT, кодируемыми различными конструкциями, молекулярными вакцинами и т. д.), сформируют новый набор инструментов, полезный для изучения биологической роли ретроэлементов в исследованиях эволюции и профилактики, предрасположенности и прогрессирования рака. Все эти варианты осуществления охватываются настоящим раскрытием.

Из вышеизложенного будет понятно, что раскрытие основано по меньшей мере частично на том понимании, что амплификация ретроэлементов, управляемая LINE RT, является основной движущей силой нестабильности генома, которая способствует как возникновению рака, так и его прогрессированию (приобретению новых свойств, таких как устойчивость к лекарственным средствам, метастатическая способность и т. д.). Раскрытие также включает установление влияния нестабильности генома на старение и возрастные расстройства. Толкование авторов изобретения, которое не должно рассматриваться ограничительно, подтверждается: (i) доказанной связью между взрывной амплификацией повторов и появлением всех основных морфологических архетипов в эволюции млекопитающих, (ii) ролью p53 в эпигенетическом сайленсинге ретроэлементов (и их частый десайленсинг в клетках с дефицитом p53), (iii) документированный десайленсинг и амплификация повторов в опухолях, и (iv) данные исследований авторов изобретения, в которых тестировали ингибирование LINE RT *in vitro* и *in vivo*.

Как обсуждалось выше, настоящее раскрытие выявляет феноменальную пластичность рака и его способность избегать естественных противораковых механизмов и применяемых методов лечения в

качестве поддающегося воздействию лекарственными средствами активного процесса, управляемого единственным эндогенным ферментом - RT^{LINE}. RT-зависимая нестабильность генома вероятно включает три типа событий: (1) инсерционный мутагенез, вызванный интеграцией новых копий LINE и их RT-управляемых SINE в функциональные области генома, (2) делеции и амплификации, вызванные гомологичной рекомбинацией между вновь интегрированными повторами, и (3) точечные мутации, запускаемые активностью эндонуклеазы, связанной с RT LINE1. Настоящее раскрытие включает оценку эффекта принудительной экспрессии RT^{LINE} в разных контекстах на геномную нестабильность соматических клеток и для определения вклада каждого типа геном-дестабилизирующего события в общий мутагенный эффект RT^{LINE} и для решения конкретных механистических вопросов относительно роли происхождения RT, вклада ORF1 и т. д.

Среди ~100000 «мертвых» элементов LINE1 (с ORF, прерванными многочисленными мутациями) в геноме человека остаются лишь несколько функциональных высокогомологичных копий LINE1. За исключением короткого периода на протяжении раннего эмбрионального развития и созревания головного мозга после рождения, они подвергаются глубокому сайленсингу на эпигенетическом уровне в нормальных соматических клетках, но часто становятся транскрипционно и трансляционно активными в опухолях. Настоящее раскрытие включает понимание того, что это способствует геномной нестабильности опухолей, таким образом выделяя RT^{LINE} в качестве целевого антигена для иммунотерапии рака, направленной на предотвращение развития и прогрессирования рака. Раскрытие, таким образом, включает разработку вакцины, способной уничтожить клетки с активными LINE1. Раскрытие соответственно включает создание вакцин и определение их (i) иммунотерапевтической эффективности в экспериментальных моделях опухолей с активными LINE1 и (ii) иммунопрофилактической эффективности в нескольких моделях склонных к раку мышей. Раскрытие также относится к применению ингибиторов RT и таких вакцин в способах ингибирования старения и/или возрастных расстройств.

Раскрытие включает использование тест-систем для количественной оценки частоты (i) ретротранспозиции, (ii) спонтанной амплификации генов и (iii) различных мутаций, инактивирующих гены (точечные мутации, делеции и т. д.). В первой тест-системе будет использован рекомбинантный вектор, названный RTAD (детектор активности ретротранспозиции), похожий на ORFEUS - вектор, ранее сконструированный для обнаружения клеток с продолжающейся ретротранспозицией. RTAD получен из мышинового функционального элемента LINE с ORF2, замененной репортерной кассетой, состоящей из генов устойчивости к пурамицину и ТК герпесвируса (чувствительность к ганцикловиру) под промотором убиквитина, клонированным в ориентации, противоположной транскрипции LINE1. В этой репортерной кассете промотор инактивируется интроном. Таким образом, экспрессия рнго и HSV ТК возможна только в том случае, если интрон отщеплен сплайсированием, и функциональная копия кДНК синтезирована из сплайсированной РНК. Поскольку этот последний шаг требует обратной транскрипции, RTAD служит детектором активности RT. Устойчивость к пурамицину будет указывать на частоту клеток в популяции с функциональной RT. Отбор ганцикловиrom можно затем использовать для уничтожения таких клеток и оценки влияния активности RT на нестабильность генома.

Амплификацию генов можно оценить путем измерения частоты встречаемости вариантов клеток, устойчивых к N-фосфоноацетил-L-аспартату (PALA), низкомолекулярному ингибитору аспарат-транскарбамилазы белка CAD, необходимого для биосинтеза UMP. В клетках человека устойчивость к PALA связана почти исключительно с гиперэкспрессией CAD из-за амплификации гена CAD.

Следовательно, это может служить количественным показателем амплификации генов. Обычно необнаруживаемая в нормальных клетках частота амплификации генов может достигать 10⁻⁵ в опухолевых клетках. Обнаружение того, что и инактивация p53, и деметилирование ДНК децитабином значительно увеличивают частоту амплификации генов, подтверждает возможность вовлечения ретроэлементов (которые на эпигенетическом уровне ингибируются p53 и метилированием ДНК) в этот процесс. В соответствии с этим авторы изобретения обнаружили, что культивирование опухолевых клеток в присутствии нетоксичных концентраций ингибиторов RT ставудина (STV) или азидоцитидина (AZT), которые, как известно, эффективны в отношении RTLINE1, значительно снижало встречаемость PALA-резистентных колоний.

Частота ген-инактивирующих мутаций может быть определена с использованием другого ряда детектирующих клеточных линий, трансдуцированных лентивирусной конструкцией PURTK, экспрессирующей описанную выше репортерную кассету рго-HSV TK, придающую устойчивость к пуромицину и чувствительность к ганцикловиру. Частота встречаемости устойчивых к ганцикловиру клонов в клеточной популяции является количественным показателем инактивации мутациями гена HSV TK. Следовательно, эти клетки можно использовать для оценки влияния различных факторов на спонтанную мутагенность.

Два типа детектирующих активность RT^{LINE1} инструментов (с RTAD и PURTK) могут быть созданы из одних и тех же наборов клеточных линий, полученных из мышинной опухоли. Эти инструменты могут быть использованы для оценки зависимости трех типов нестабильности генома - инсерционного мутагенеза, амплификации генов и точечных мутаций - от активности RT из разных источников: (i) полноразмерных LINE (природная и усиленная активным промотором коэкспрессия ORF1 и ORF2), (ii) RT^{LINE1} отдельно (для определения влияния ORF1), и (iii) RT различного происхождения (MoMuLV RT - отдельно или внутри LINE1 вместо ORF2). Природа ожидаемых мутационных событий в выбранных клетках может быть проанализирована, как описано здесь.

Набор конструкций-«модификаторов» может быть использован для определения способности экспрессии RT спровоцировать спонтанную трансформацию *in vitro*. Будут использованы две модельные системы, которые были успешно использованы в предыдущей работе авторов изобретения, обе из которых включают конверсию нетрансформированных фибробластов, полученных из Balb/c 3T3 мыши (клоны (12)1 и (10)1), в трансформированные субстратнезависимые озлокачествленные клетки. Клетки (10)1 являются p53-дефицитными и склонны к трансформации активированным мутантом Ras, в то время как клетки (12)1 являются диким типом по p53 и требуют инактивацию p53 для Ras-опосредованной трансформации. Оба типа могут быть трансфицированы всеми конструкциями-модификаторами по отдельности (линия (12)1) или в комбинации с V-Ha-Ras под промотором SV40 (линия (12)1). Частота клеток в трансдуцированных популяциях, способных к субстратнезависимому росту вследствие приобретения мутаций, которые либо активируют доминантные онкогены, либо подавляют p53 (в случае (10)1 и (12)1, соответственно), может быть измерена.

Ожидается, что RTAD обеспечит новый мощный генетический инструмент не только для мониторинга активности ретроэлементов, но также для контроля стабильности генома в клеточных популяциях путем уничтожения клеток с активированными повторами. Таким образом, раскрытие включает создание трансгенных мышей, несущих RTAD в своей зародышевой линии, для применения в качестве модели для

оценки *in vivo* возможности уничтожения RT^{LINE1}-экспрессирующих клеток с целью профилактики рака, а также старения и возрастных расстройств.

Как обсуждалось выше, раскрытие охватывает подходы к индукции адаптивного иммунитета против клеток с активными ретроэлементами и для оценки их эффективности в профилактике и лечении рака. Раскрытие охватывает все вакцины, которые могут функционировать в способах согласно раскрытию. В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к двум различным типам вакцин: (i) на белковой основе (сплит-вакцине) и (ii) аденовирусной вакцине на генной основе, и комбинациям таких подходов для применения, например, в схемах «прайм-буст». Раскрытие включает структурную оптимизацию ORF1 и ORF2 LINE1, которая может включать удаление иммуносупрессивных эпитопов T-reg и регулирование содержания кодонов для улучшения уровней экспрессии антигенов. Генетические последовательности, кодирующие секретируемые формы ORF1 и ORF2, могут быть созданы, например, путем добавления лидерных пептидов в соответствии с установленными подходами. В дополнение к рекомбинантным антигенам ORF1 и ORF2 в сплит-вакцину могут быть включены различные комбинации молекулярных адъювантов, представляющих агонисты паттерн-распознающих рецепторов (TLR7/8, NOD1/2). Иммуногенность разработанных вакцин на основе генов может быть повышена путем добавления в аденовирусный вектор дополнительной ORF, кодирующей энтолимода - производное флагеллина сальмонеллы, агонист TLR5 и мощный иммуноадъювант. Вакцинные композиции могут быть протестированы на их способность активировать клеточные компоненты иммунитета, например путем обнаружения маркеров активации лимфоцитов (CD107, CD69, CD25, CD44) на основе FACS, анализа пролиферативного ответа и продукции цитокинов (IFN- γ , IL-2, TNF) антиген-специфичных CD4+ и CD8+ T-лимфоцитов при их стимуляции антигенами ORF1 и ORF2. Противоопухолевая эффективность композиций как на основе генов, так и сплит-вакцин может быть протестирована с использованием любых подходящих подходов, включая, не ограничиваясь этим, модели опухолей *in vivo*, которые включают генетически модифицированные опухолевые клетки, описанные выше, и экспрессирующие антигены ORF1/ORF2 LINE1 наряду с RTAD и выращенные в виде подкожно трансплантированных опухолей у сингенных мышей. Функциональная эффективность экспериментальных вакцин в трансплантированных моделях может быть проверена в профилактических и лечебных режимах, как описано где-либо, например для противораковых вакцин на основе энтолимоды. Эффективность вакцин против LINE1 для профилактики спонтанных видов рака может быть проверена на общепринятых генетических моделях мышей, предрасположенных к раку молочной железы (MMTV-neu), простаты (PTEN гемизиготный) или множественным раковым заболеваниями (дефицитный по p53, p53 гемизиготный при облучении всего организма). Животных можно иммунизировать вакцинными препаратами в возрасте около 12 недель и наблюдать на предмет развития рака вместе с контрольными группами плацебо. Будут зарезервированы животные для промежуточного анализа в периоды обнаруживаемых гиперпластических поражений органов-мишеней. Реализация этих подходов, как ожидается, демонстрирует существенные профилактические и лечебные эффекты вакцин против LINE1 (продление безопухолевой жизни, подавление роста или регрессия опухоли). Экспрессию антигенов LINE1 можно сравнить в опухолях, растущих у вакцинированных и контрольных животных.

В свете вышеприведенного описания будет очевидно, что это раскрытие, как ожидается, приведет к многочисленным практическим медицинским применениям и предоставит широко применимые решения для лечения и профилактики рака, старения и связанных с возрастом заболеваний и состояний, для которых в настоящее время не имеется подходящий подход к лечению или универсальная мишень.

Следующие примеры предназначены для того, чтобы проиллюстрировать, но не ограничить изобретение.

Пример 1

На Фигуре 1, без намерения быть ограниченным какой-либо конкретной теорией, представлено схематическое описание новой парадигмы, в которой излагаются новые методы противоракового и противовозрастного лечения, основанные на фармакологическом и иммунотерапевтическом нацеливании на клетки, экспрессирующие обратную транскриптазу, кодируемую семейством элементов LINE1 (LINE1 RT). В частности, Фигура 1 схематически изображает возникновение и прогрессирование рака, а также старение у млекопитающих в результате спонтанной эпигенетической дерепрессии эндогенных ретротранспозонов и их экспансии в геном через механизм, управляемый LINE1 RT. LINE1 RT обеспечивает синтез и интеграцию копий кДНК различных клеточных РНК, включая РНК ретротранспозонов LINE1 и SINE. Этот процесс провоцирует различные типы мутагенеза (инсерционный, делеции, амплификации, точечные мутации) и активацию воспаления (через ответ на повреждение ДНК и индукцию интерферона). LINE1 RT-индуцированный мутагенез приводит к накоплению генетически и фенотипически измененных клеток, инициирующих рак. Если этот процесс протекает в популяции раковых клеток, он ускоряет развитие опухоли, включая приобретение новых злокачественных и устойчивых к лечению свойств. В популяциях нормальных соматических клеток это приводит к накоплению клеток с провоспалительными свойствами (например, старых клеток) и стимулирует возрастное увеличение спонтанного системного воспаления асептического типа. Ожидается, что ингибиторы LINE1 RT, включая небольшие молекулы, способные ингибировать полимеразную и/или эндонуклеазную активность этого многофункционального фермента, при применении к здоровому организму будут подавлять старение и развитие рака и могут использоваться для профилактики рака и старения. При применении к организмам, имеющим рак, такие ингибиторы подавляют способность рака накапливать дополнительные мутации, тем самым замедляя прогрессирование рака. Как описано выше, ожидается, что ингибиторы RT являются подходящими для применения в комбинации с любым видом лечения рака, для того чтобы сделать лечение более эффективным путем подавления приобретения устойчивости к лечению.

Пример 2

Этот пример обобщен на Фигуре 2, где представлены доказательства, демонстрирующие способность типичного анти-ВИЧ лекарственного средства, ингибитора RT ВИЧ ставудина, ингибировать ретротранспозицию элементов LINE1 в пределах нетоксичного диапазона концентраций. Ретротранспозиционный анализ проводили согласно Moran et al. Cell. 1996 87(5):917-27 (схема показана слева). Клетки HeLa трансфицировали репортерной плазмидой; появление неустойчивых колоний свидетельствует о событиях ретротранспозиции. Ставудин эффективен при концентрациях выше 5 мМ. Нижняя панель демонстрирует отсутствие влияния указанных концентраций ставудина на клоногенность клеток HeLa. Соответственно ожидается, что другие ингибиторы RT будут иметь аналогичную применимость.

Пример 3

Этот пример обобщен на Фигуре 3, которая показывает, что репрезентативные ингибиторы RT, ставудин (STV) и азидотимидин (AZT), которые, как продемонстрировано в данном документе, являются эффективными против LINE1 RT (см. Фигуру 2), подавляют приобретение вариантов клеток, устойчивых к лекарственным средствам, в популяции клеток колоректального рака HCT116. В частности, в качестве

модели лекарственной устойчивости, приобретенной *in vitro*, авторы изобретения осуществляли отбор клеток в присутствии N-(фосфоацетил)-L-аспартата (PALA) - препарата, который специфично ингибирует аспартаттранскарбамилазную активность многофункционального фермента CAD и отбирает по признаку амплификации гена CAD (Stark G. R. and Wahl G. M., 1984. *Annu. Rev. Biochem.* 53:447-503). Otto с соавторами (*J Biol Chem.* 19889. 264: 3390-3396) продемонстрировали поразительную параллель между способностью клеточных линий становиться устойчивыми к PALA и способностью этих же клеток образовывать опухоли после инъекции в сингенных животных. Рост клеток в присутствии указанных концентраций STV и AZT резко снижает количество колоний, устойчивых к PALA (гистограммы на левой панели), что свидетельствует о том, что ингибирование LINE1 RT способно подавлять накопление лекарственной устойчивости и уменьшать количество большинства онкогенных клеток, инициирующих опухоль, в популяциях опухолевых клеток. Правая панель иллюстрирует данные, представленные на графике, в виде изображений чашек с тканевыми культурами, обработанными и необработанными ингибиторами RT в присутствии и в отсутствие PALA. Чувствительность клеток HCT116 к ингибиторам RT в отдельности определяли с использованием количественного определения адгезивных клеток после 72 часов инкубации в присутствии ингибиторов RT в диапазоне концентраций (кривые на графике со шкалой клеточной жизнеспособности, показанном справа).

Пример 4

Этот пример обобщен на Фигуре 4, которая демонстрирует, что ингибитор RT ВИЧ ставудин, который, как показано в настоящем документе, способен ингибировать LINE1 RT (Фиг. 2), продлевает безопуховое выживание самцов мышей C57BL6/j, дефицитных по p53. Дефицитные по p53 мыши были использованы в качестве модели сниженной продолжительности жизни из-за спонтанного развития опухолей. Мышей, начиная с 10-недельного возраста, содержали с доступом к неподкисленной питьевой воде с добавлением 1,5 мг/мл ставудина или без такого добавления (группы «ставудин» и «носитель», соответственно), и регистрировали спонтанные смерти (или эвтаназию умирающих животных или животных с опухолью, объем которой превышает допустимые пределы). Ставудин в воде продлевал медианную продолжительность жизни на 43 %, что свидетельствует о потенциальной противораковой и противовозрастной активности ингибитора RT. Неподкисленную воду использовали для сохранения стабильности ставудина в растворе.

Пример 5

Этот пример обобщен на Фигуре 5, которая демонстрирует, что репрезентативный ингибитор RT ставудин задерживает возникновение и уменьшает частоту рецидивов опухоли после первоначального ответа на стандартную химиотерапию в модели спонтанной нейробластомы у мышей. В частности, 100 % Th-MYCN трансгенных мышей (линия 129X1/SvJ-Tg(TH-MYCN)41Waw/Nci), гомозиготных по трансгену MYCN, развивают спонтанные нейробластомы в брюшной полости в возрасте около 30 дней. У мышей, несущих этот трансген, проявляются многие признаки детской болезни человека, в том числе чувствительность к традиционным методам лечения. Указанное лечение было начато во время первого появления пальпируемых опухолей. Мышей содержали с доступом к неподкисленной питьевой воде, с добавлением или без добавления 1,5 мг/мл ставудина, либо непрерывно, либо в течение указанного времени. Как видно из графиков, ставудин отдельно не обнаруживал определяемого противоопухолевого эффекта. Лечение комбинацией циклофосамида и топотекана продлевало безопуховую жизнь мышей в среднем в течение 4 недель с последующим отрастанием опухоли и умерщвлением животного вследствие критического размера

опухоли. Непрерывное лечение ставудином значительно задерживало рецидивы опухоли, увеличивая среднюю безопухолевую выживаемость почти вдвое, и значительно увеличивало долю неболеющих животных без рецидивов, обнаруженных в течение более 100 дней наблюдения. Эти результаты подтверждают предполагаемое применение ингибиторов RT в качестве супрессоров опухолевого прогрессирования в сочетании со стандартными противораковыми схемами.

Хотя варианты осуществления были подробно описаны для целей иллюстрации, понятно, что такие подробности предназначены исключительно для этой цели, и специалисты в данной области техники могут внести в них изменения, не отступая от сущности и объема раскрытия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения генетической нестабильности в популяции эукариотических клеток, включающий введение в клетки ингибитора обратной транскриптазы (RT) с тем, чтобы ингибировать активность RT, кодируемой ORF2 LINE1 (где RT обозначается как RTLINE), в клетках, и вследствие чего клетки проявляют сниженную генетическую нестабильность.

2. Способ по п. 1, в котором популяция клеток включает раковые клетки, предраковые клетки, соматические клетки или их комбинацию.

3. Способ по п. 2, включающий введение ингибитора RT в потомство популяции клеток, и при этом потомство популяции клеток обладает сниженной генетической нестабильностью.

4. Способ по п. 2, в котором сниженная генетическая нестабильность охватывает клетки, проявляющие по меньшей мере одно из следующего: меньшее количество точечных мутаций, меньшее количество хромосомных инсерций, меньшее количество хромосомных делеций, меньшее количество амплификаций, уменьшение способности к метастазированию, уменьшение способности к иммортализации или уменьшение развития устойчивости к одному или нескольким фармацевтическим агентам, где генетическая нестабильность снижена относительно контроля.

5. Способ по п. 4, в котором: i) точечные мутации вызваны по меньшей мере частично эндонуклеазной активностью интегразного компонента RT; ii) инсерции включают интеграцию новых копий одного или нескольких повторяющихся элементов, или интеграцию новых псевдогенов, или комбинацию указанного; iii) делеции включают потерю сегмента хромосомы, который окружен интегрированными копиями повторяющихся элементов; iv) амплификации включают новые копии фрагментов генома, которые содержат один или несколько функциональных генов, окруженных вновь интегрированными копиями повторяющихся элементов.

6. Способ по п. 4, где по меньшей мере некоторые клетки в популяции клеток и/или потомство указанных клеток проявляют по меньшей мере одно из следующего: i) меньшую устойчивость к фармацевтическому агенту, и/или ii) сниженную метастатическую способность, или iii) меньше признаков старения, по сравнению с контролем.

7. Способ по п. 4, где контроль включает величину генетической нестабильности, найденную для клеток, в которых активность RT не ингибируется.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где популяция клеток присутствует *in vitro* или присутствует в многоклеточном организме.

9. Способ по п. 8, в котором популяция клеток представляет собой клетки млекопитающих.

10. Способ по п. 9, в котором клетки млекопитающих представляют собой клетки человека.

11. Способ по п. 9, в котором популяция клеток не инфицирована вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и клетки в популяции не содержат интегрированного провируса ВИЧ.

12. Способ по п. 11, в котором популяция клеток входит в состав солидной опухоли, или популяция клеток содержит раковые клетки крови.

13. Способ по п. 11, в котором популяция клеток включает раковые клетки в индивидууме, и введение ингибитора RT выполняют на протяжении периода времени, в течение которого: i) раковые клетки не развивают устойчивость к химиотерапевтическому агенту, который также вводят индивидууму в течение этого периода времени, и/или ii) раковые клетки развивают меньшую, по сравнению с контролем, устойчивость к химиотерапевтическому агенту, который также вводят индивидууму в течение этого периода времени.

14. Способ по п. 11, в котором популяция клеток включает соматические клетки в индивидууме, и введение ингибитора RT выполняют на протяжении периода времени, в течение которого индекс дряхлости индивидуума улучшается, или ухудшение индекса дряхлости индивидуума замедляется относительно контроля.

15. Способ определения того, является ли тестируемый агент(ы) кандидатом для применения в качестве ингибитора обратной транскриптазы (RT) в способе по п. 11, причем способ включает:

i) приведение клеток, которые экспрессируют RT, кодируемую ORF2 LINE1 (RTL1NE), в контакт с одним или несколькими тестируемыми агентами;

ii) тестирование на изменение генетической нестабильности в клетках; и

iii) установление того, что тестируемый агент является кандидатом, путем определения сниженной генетической нестабильности в клетках и/или их потомстве относительно контроля; или

iii) установление того, что тестируемый агент не является кандидатом, путем определения отсутствия снижения генетической нестабильности или её увеличения в клетках и/или их потомстве по сравнению с контролем.

16. Способ по п. 15, в котором снижение генетической нестабильности охватывает клетки, проявляющие по меньшей мере одно из следующего: меньшее количество точечных мутаций, меньшее количество хромосомных инсерций, меньшее количество хромосомных делеций, меньшее количество амплификаций, уменьшение способности к метастазированию, уменьшение способности к иммортализации или уменьшение развития устойчивости к одному или нескольким фармацевтическим агентам, по сравнению с контролем.

17. Способ по п. 16, дополнительно включающий приведение клеток в контакт с химиотерапевтическим агентом для определения того, подавляет ли ингибитор RT развитие устойчивости к химиотерапевтическому агенту.

18. Способ по п. 16, в котором изменение генетической нестабильности определяют с использованием обнаруживаемого репортера, при котором обнаруживаемый репортер указывает на ответ на повреждение ДНК.

19. Способ уменьшения количества клеток, которые проявляют генетическую нестабильность, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей один или несколько агентов, которые способны избирательно уничтожать клетки, которые проявляют генетическую нестабильность, при этом клетки, которые проявляют генетическую нестабильность, идентифицируют по экспрессии функциональных LINE1.

20. Способ по п. 19, в котором один или несколько агентов включают, полностью или в виде сегмента, один или два белка, кодируемых элементами LINE1 (ORF1 и ORF2), или один или несколько агентов включают вектор(ы) экспрессии, кодирующий указанные один или два белка или их сегмент(ы), при этом белок (белки) или их сегмент(ы) могут стимулировать иммунный ответ против клеток, которые проявляют генетическую нестабильность.

21. Способ по п. 20, в котором композиция, содержащая один или несколько агентов, дополнительно содержит один или несколько иммуноадъювантов и/или иммуномодуляторов, и/или вектор(ы) экспрессии кодирует один или несколько иммуноадъювантов и/или иммуномодуляторов.

22. Способ по любому из пп. 19-21, в которых один или несколько агентов включают нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы или нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы.

23. Способ по п. 22, в котором один или несколько агентов включают ставудин, или ламивудин, или их комбинацию.

24. Способ идентификации стимула, который вызывает генетическую нестабильность, включающий воздействие тестируемым стимулом на клетки и тестирование клеток на увеличение активности RT, кодируемой ORF2 LINE1 (RTLINE), при этом увеличение активности RT указывает на то, что стимул вызывает генетическую нестабильность.

25. Способ идентификации индивидуума в качестве кандидата для лечения ингибитором обратной транскриптазы (RT), кодируемой ORF2 LINE1 (RTLINE), или вакциной, которая стимулирует экспрессию иммунного ответа против клеток, которые проявляют генетическую нестабильность, которая может быть идентифицирована по экспрессии функциональных LINE1, причем способ включает тестирование образца, полученного от индивидуума, для определения меры генетической нестабильности и сравнение меры генетической нестабильности с контролем, при этом более высокая генетическая нестабильность по сравнению с контролем указывает на то, что индивидуум является кандидатом для лечения.

26. Способ по п. 25, в котором мера генетической нестабильности включает по меньшей мере одну характеристику для: точечных мутаций, хромосомных инсерций, хромосомных делеций, генных амплификаций, метастатической способности клеток индивидуума, способности клеток индивидуума к иммортализации или экспрессии повторов ДНК LINE1 в клетках индивидуума.

27. Способ по п. 25 или п. 26, дополнительно включающий введение ингибитора RT и/или вакцины индивидууму.

28. Способ мониторинга эффективности лечения, направленного на подавление развития устойчивости к лечению фармацевтическим агентом, включающий тестирование образца клеток индивидуума для определения меры генетической нестабильности в первый момент времени в процессе лечения и сравнение этой меры с контролем, при этом отсутствие увеличения генетической нестабильности по сравнению с контролем указывает на достаточную эффективность лечения.

29. Способ по п. 28, в котором увеличение генетической нестабильности в первый момент времени указывает на недостаточную эффективность лечения.

30. Способ по п. 29, включающий корректировку дозировки лечения и тестирование второго образца клеток от индивидуума для определения меры генетической нестабильности для установления того, была ли корректировка дозировки достаточной для подавления развития устойчивости.

31. Способ по любому из пп. 28-30, в которых лечение является лечением рака, и в которых агент представляет собой химиотерапевтическое средство или вакцину.

32. Способ профилактики и/или терапии патологии, коррелирующей с накоплением соматических клеток, способных к самопроизвольной генерации генетических изменений независимо от клеточных делений, где такие клетки могут характеризоваться экспрессией функциональных элементов LINE1, причем способ включает введение индивидууму ингибитора обратной транскриптазы (RT) с тем, чтобы ингибировать активность RT, кодируемой ORF2 LINE1 (RTLINE), в соматических клетках, и/или введение индивидууму вакцины с тем, чтобы стимулировать иммунологический ответ на соматические клетки.

33. Способ по п. 32, в котором патология включает рак или пролиферативные расстройства, выбранные из: миелодиспластического синдрома или доброкачественных опухолей, или aberrантной иммуномодуляции, представляющей собой индукцию и/или обострение воспаления, которое инициирует или ускоряет старение и/или злокачественную трансформацию соматических клеток.

34. Способ по п. 33, в котором патология включает спонтанное старение и/или одно или несколько состояний, связанных со старением и/или спонтанным старением.

35. Способ по любому из пп. 32-34, в котором изменение в патологии может быть обнаружено путем определения изменения индекса дряхлости у индивидуума.

36. Способ по п. 35, в котором изменение индекса дряхлости измеряют в различные моменты времени для оценки эффективности способа профилактики и/или терапии.

37. Способ лечения и/или предотвращения возрастных состояний у индивидуума, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей один или несколько агентов, которые способны избирательно уничтожать клетки, которые проявляют генетическую нестабильность, причём клетки, которые проявляют генетическую нестабильность, могут быть идентифицированы по экспрессии функциональных LINE1.

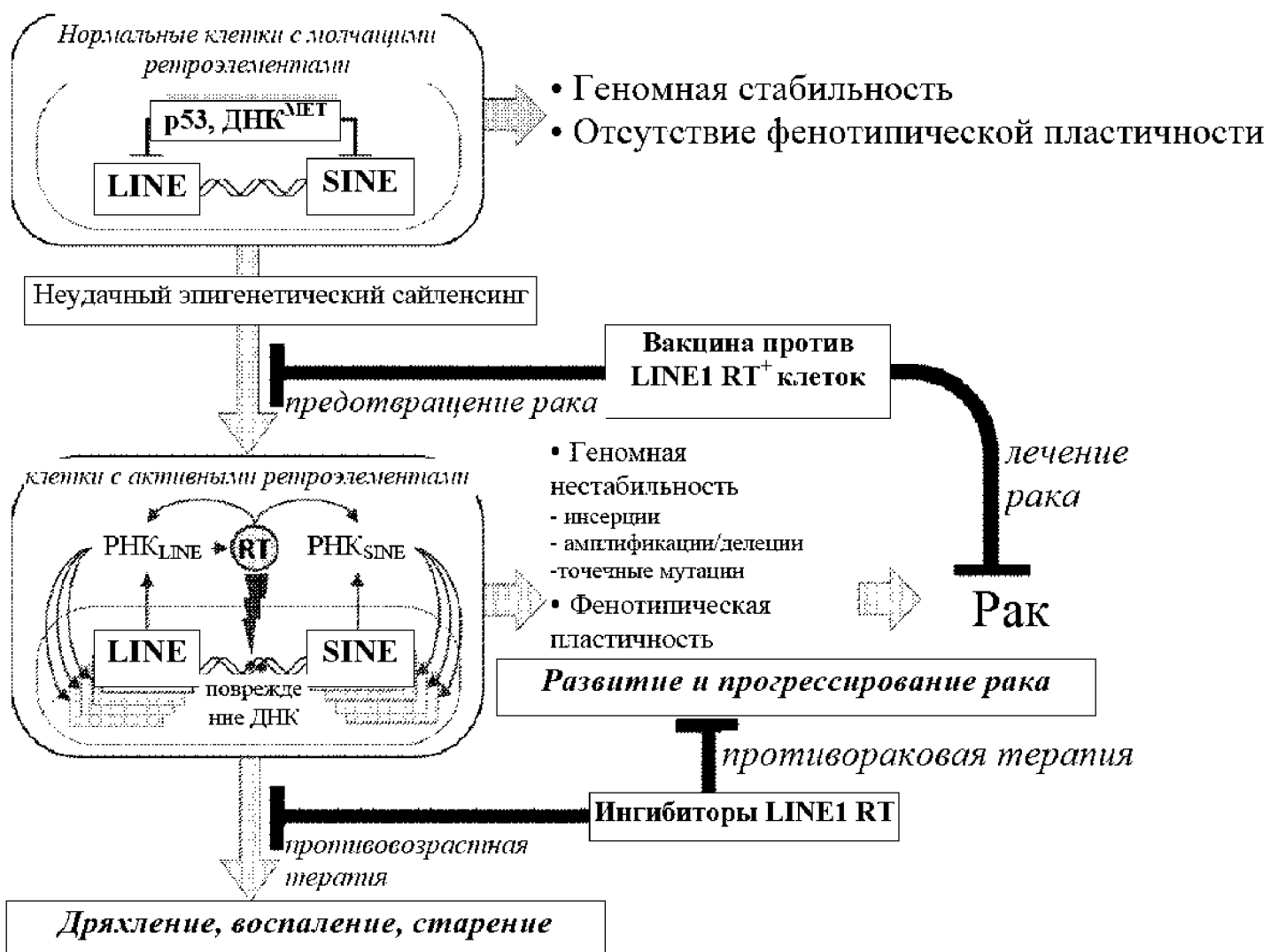
38. Способ по п. 37, в котором один или несколько агентов включают, полностью или в виде сегмента, один или два белка, кодируемых элементами LINE1 (ORF1 и ORF2), или один или несколько агентов включают вектор(ы) экспрессии, кодирующий указанный один или два белка или их сегмент(ы), при этом белок (белки) или его сегмент(ы) могут стимулировать иммунный ответ против клеток, которые проявляют генетическую нестабильность.

39. Способ по п. 37, в котором композиция, содержащая один или несколько агентов, дополнительно содержит один или несколько иммуoadъювантов и/или иммуномодуляторов, и/или вектор(ы) экспрессии кодирует один или несколько иммуoadъювантов и/или иммуномодуляторов.

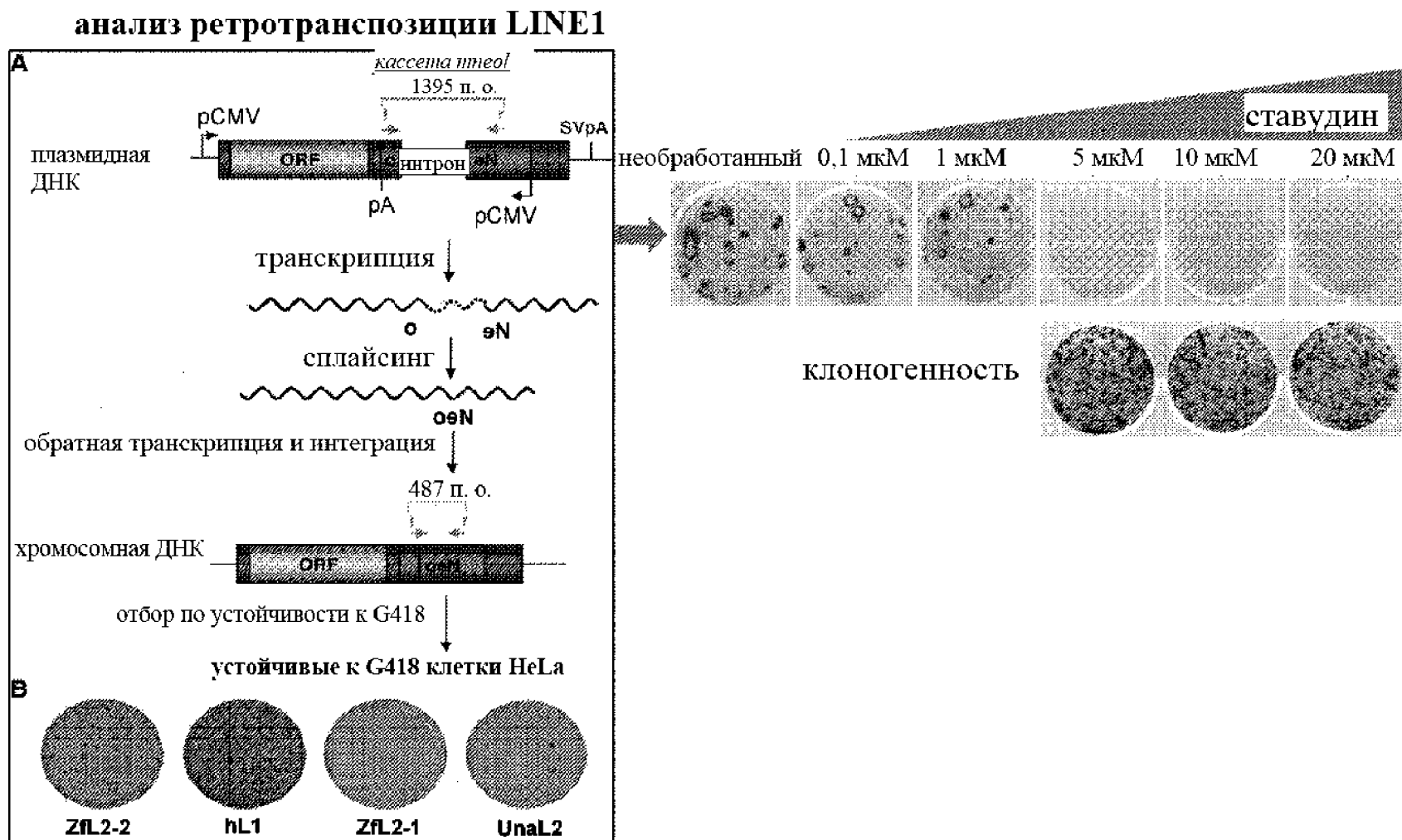
40. Способ по любому из пп. 37-39, в которых один или несколько агентов включают нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы или нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы.

41. Способ сенсibilизации раковых клеток к химиотерапевтическому агенту, включающий введение в раковые клетки химиотерапевтического агента и ингибитора обратной транскриптазы (RT), при этом раковые клетки не инфицированы вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и раковые клетки не содержат интегрированный провирус ВИЧ.

Фиг. 1

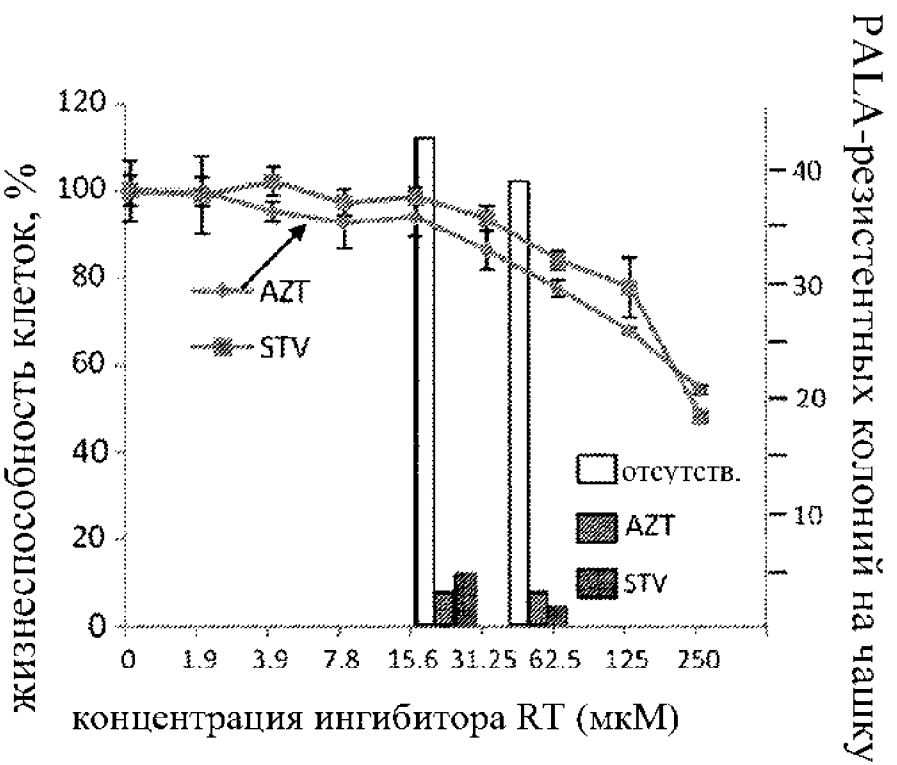
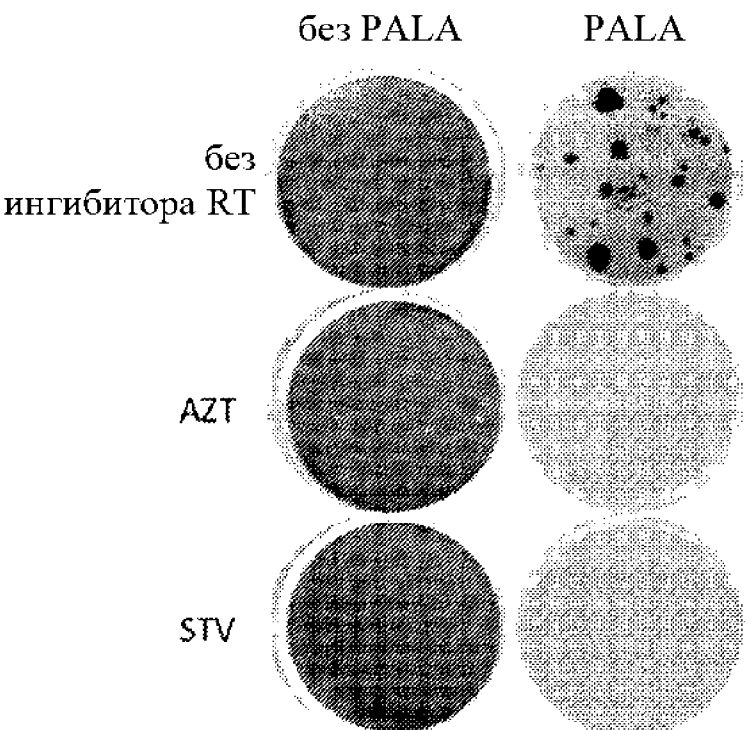


Фиг. 2

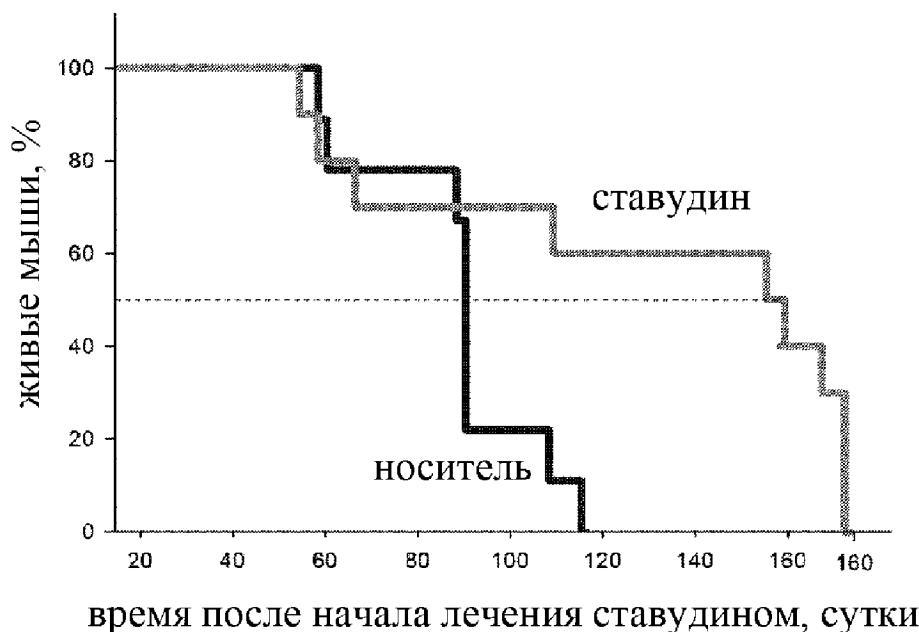


Ингибирование эндогенной обратной транскриптазы
и таргетирование клеток для профилактики
и терапии рака и старения

Фиг. 3

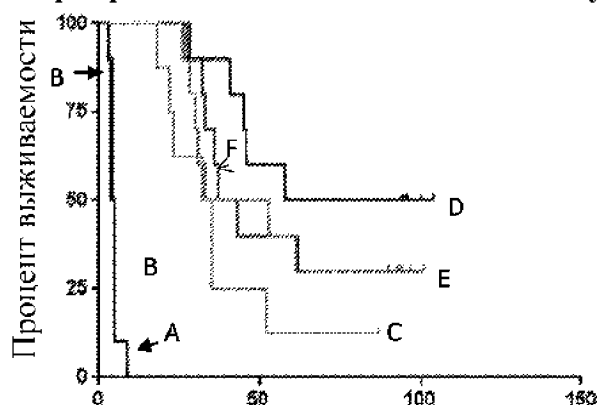


Фиг. 4



Фиг. 5

Th-MYCN гомозиготные мыши, обработанные циклофосфамидом/топотеканом со ставудином



Время до образования средней пальпируемой опухоли от начала лечения

- A — нормальная неподкисленная питьевая вода
 B — 250 мг/250 мл ставудина в неподкисленной питьевой воде
 C — 10 мг/кг циклофосфамида + 0.5 мг/кг топотекана
 D — 10 мг/кг циклофосфамида + 0.5 мг/кг топотекана + ставудин НЕПРЕРЫВНО
 E — 10 мг/кг циклофосфамида + 0.5 мг/кг топотекана + ставудин ТОЛЬКО 5 СУТОК
 F — 10 мг/кг циклофосфамида + 0.5 мг/кг топотекана + ЗАТЕМ ставудин НЕПРЕРЫВНО
- н.с.
 $p = 0.39$
 $p = 0.02$ н.с.
 $p = 0.28$ н.с.
 $p = 0.17$

1 животное «Цикло/Топо» было отбраковано из-за инфекции уха и исключено

нормальная неподкисленная питьевая вода против «Цикло/Топо»

нормальная неподкисленная питьевая вода против «Став НЕПРЕРЫВНО»

нормальная неподкисленная питьевая вода против «Став 5 СУТОК»

нормальная неподкисленная питьевая вода против «ЗАТЕМ Став НЕПРЕРЫВНО»

$p < 0.0001$ для всех