



(51) МПК
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2015128057, 12.12.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

12.12.2012 US 61/736,527;
 02.01.2013 US 61/748,427;
 30.01.2013 US 61/758,468;
 25.02.2013 US 61/769,046;
 15.03.2013 US 61/791,409;
 15.03.2013 US 61/802,174;
 28.03.2013 US 61/806,375;
 20.04.2013 US 61/814,263;
 06.05.2013 US 61/819,803;
 28.05.2013 US 61/828,130;

(см. прод.)

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2019 Бюл. № 09

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 13.07.2015

(86) Заявка РСТ:
 US 2013/074667 (12.12.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2014/093622 (19.06.2014)

Адрес для переписки:
 109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
 "Союзпатент"

(71) Заявитель(и):

**ТЕ БРОД ИНСТИТЮТ, ИНК. (US),
 МАССАЧУСЕТС ИНСТИТЮТ ОФ
 ТЕКНОЛОДЖИ (US),
 ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУЗ ОФ
 ХАРВАРД КОЛЛИДЖ (US)**

(72) Автор(ы):

**ЧЖАН Фэн (US),
 ХАЙДЕНРАЙХ Маттиас (US),
 ЖАНЬ Фэй (US),
 СУИЧ Лукаш (US)**

(54) ДОСТАВКА, КОНСТРУИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМ, СПОСОБОВ И КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ И ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ

(57) Формула изобретения

1. Способ модификации организма или отличного от человека организма путем манипуляции с целевой последовательностью в представляющем интерес локусе генома, включающий

доставку не встречающейся в природе или сконструированной композиции, содержащей:

А) - I. полинуклеотидную последовательность химерной РНК (chiRNA) системы CRISPR-CAS, где полинуклеотидная последовательность содержит:

(а) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой

последовательностью в эукариотической клетке,

(b) парную tracr-последовательность и

(c) tracr-последовательность, и

II. полинуклеотидную последовательность, кодирующую фермент CRISPR, необязательно содержащий по меньшей мере одну или несколько последовательностей ядерной локализации,

где (a), (b) и (c) расположены в 5'-3' ориентации,

где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизуется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, и

где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизуется с tracr-последовательностью, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая фермент CRISPR представляет собой ДНК или РНК,

или

(B) I. полинуклеотиды, содержащие:

(a) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке, и

(b) по меньшей мере одну или несколько парных tracr-последовательностей,

II. полинуклеотидную последовательность, кодирующую фермент CRISPR, и

III. полинуклеотидную последовательность, содержащую tracr-последовательность, где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизуется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, и

где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизуется с tracr-последовательностью, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая фермент CRISPR представляет собой ДНК или РНК.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что любая или все из полинуклеотидной последовательности, кодирующей фермент CRISPR, направляющей последовательности, парной tracr-последовательности или tracr-последовательности представляют собой РНК.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что полинуклеотиды, кодирующие последовательность, кодирующую фермент CRISPR, направляющую последовательность, парную tracr-последовательность или tracr-последовательность, представляют собой РНК, и их доставляют посредством липосом, наночастиц, экзосом, микропузырьков или генной пушки.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что полинуклеотиды содержатся в векторной системе, содержащей один или несколько векторов.

5. Способ модификации организма или отличного от человека организма путем манипуляции с целевой последовательностью в представляющем интерес локусе генома, включающий

доставку не встречающейся в природе или сконструированной композиции, содержащей вирусную векторную систему, содержащую один или несколько вирусных векторов, функционально кодирующих композицию для их экспрессии, где композиция содержит:

(А) не встречающуюся в природе или сконструированную композицию, содержащую векторную систему, содержащую один или несколько векторов, содержащих

I. первый регуляторный элемент, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью химерной РНК (chiRNA) системы CRISPR-CAS, где полинуклеотидная последовательность содержит

- (а) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке,
- (b) парную tracr-последовательность и
- (с) tracr-последовательность, и

II. второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, необязательно содержащий по меньшей мере одну или несколько последовательностей ядерной локализации, где (а), (b) и (с) расположены в 5'-3' ориентации,

где компоненты I и II находятся в одном и том же или разных векторах системы, где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизуется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, и

где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизуется с tracr-последовательностью,

или

(В) не встречающуюся в природе или сконструированную композицию, содержащую векторную систему, содержащую один или несколько векторов, содержащих

I. первый регуляторный элемент, функционально связанный с

(а) направляющей последовательностью, способной гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке, и

(b) по меньшей мере одной или несколькими парными tracr-последовательностями,

II. второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, и

III. третий регуляторный элемент, функционально связанный с tracr-последовательностью,

где компоненты I, II и III находятся в одном и том же или разных векторах системы,

где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизуется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, и

где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизуется с tracr-последовательностью.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что один или несколько из вирусных векторов доставляют посредством липосом, наночастиц, экзосом, микропузырьков или генной пушки.

7. Способ лечения или подавления состояния, вызванного дефектом в целевой последовательности в представляющем интерес локусе генома у субъекта или отличного от человека субъекта, нуждающегося в этом, включающий модификацию субъекта или отличного от человека субъекта путем манипуляции с целевой последовательностью, и где состояние является чувствительным к лечению или подавлению путем манипуляции

с целевой последовательностью, включающий обеспечение лечения, предусматривающего:

доставку не встречающейся в природе или сконструированной композиции, содержащей векторную систему на основе AAV или лентивируса, содержащую один или несколько векторов на основе AAV или лентивируса, функционально кодирующих композицию для их экспрессии, где манипуляцию с целевой последовательностью осуществляют с помощью композиции при ее экспрессии, где композиция содержит:

(А) не встречающуюся в природе или сконструированную композицию, содержащую векторную систему, содержащую один или несколько векторов, содержащих

I. первый регуляторный элемент, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью химерной РНК (chiRNA) системы CRISPR-CAS, где полинуклеотидная последовательность содержит

(а) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке,

(b) парную tracr-последовательность и

(с) tracr-последовательность, и

II. второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, содержащий по меньшей мере одну или несколько последовательностей ядерной локализации,

где (а), (b) и (с) расположены в 5'-3' ориентации,

где компоненты I и II находятся в одном и том же или разных векторах системы,

где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизуется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, и

где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизуется с tracr-последовательностью,

или

(В) не встречающуюся в природе или сконструированную композицию, содержащую векторную систему, содержащую один или несколько векторов, содержащих

I. первый регуляторный элемент, функционально связанный с

(а) направляющей последовательностью, способной гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке, и

(b) по меньшей мере одной или несколькими парными tracr-последовательностями,

II. второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, и

III. третий регуляторный элемент, функционально связанный с tracr-последовательностью,

где компоненты I, II и III находятся в одном и том же или разных векторах системы,

где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизуется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, и

где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизуется с tracr-последовательностью.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способ выполняют *in vitro* и/или *ex vivo*.

9. Способ по п. 1, включающий индуцирование экспрессии.
10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что организм или субъект является эукариотом.
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что организм или субъект является отличным от человека эукариотом.
12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что организм или субъект является млекопитающим или отличным от человека млекопитающим.
13. Способ по п. 4, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой вектор на основе AAV или лентивируса.
14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ферментом CRISPR является Cas9.
15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что экспрессия направляющей последовательности находится под контролем промотора T7 и управляется экспрессией полимеразы T7.
16. Способ доставки фермента CRISPR по любому из предыдущих пунктов, включающий доставку в клетку мРНК, кодирующей фермент CRISPR.
17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что полинуклеотид или кодирующую фермент последовательность, кодирующие фермент CRISPR, доставляют в клетку путем доставки мРНК, кодирующей фермент CRISPR, в клетку.
18. Способ получения вектора на основе AAV или лентивируса по п. 7, включающий трансфекцию плазмиды(плазмид), содержащих молекулу(молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующую AAV или лентивирус, или состоящих, по сути, из них, в клетки, инфицированные AAV или инфицированные лентивирусом, и обеспечение AAV или гер и/или сар AAV или лентивируса и/или вспомогательных молекул нуклеиновой кислоты, обязательных для репликации и упаковки AAV или лентивируса.
19. Способ получения вектора на основе AAV или лентивируса для применения в способе по п. 7, включающий трансфекцию плазмиды(плазмид), содержащих молекулу(молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующую AAV или лентивирус, или состоящих, по сути, из них, в клетки, инфицированные AAV или инфицированные лентивирусом, и обеспечение AAV AAV или гер и/или сар лентивируса и/или вспомогательных молекул нуклеиновой кислоты, обязательных для репликации и упаковки AAV или лентивируса.
20. Способ по п. 18, отличающийся тем, что гер и/или сар AAV или лентивируса, обязательные для репликации и упаковки AAV или лентивируса, обеспечивают путем трансфекции клеток плазмидой-помощником(плазмидами-помощниками) или вирусом-помощником(вирусами-помощниками).
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что вирусом-помощником является поксвирус, аденовирус, лентивирус, герпесвирус или бакуловир.
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что поксвирусом является вирус коровьей оспы.
23. Способ по п. 18, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки млекопитающего.
24. Способ по п. 18, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки насекомого, а вирус-помощник (если присутствует) представляет собой бакуловир.
25. Способ по п. 1, отличающийся тем, что целевая последовательность фланкируется на своем 3' конце или за ней следует 5'-NRG (где N представляет собой любой нуклеотид), или где фермент CRISPR получают из (или происходит из) рода, принадлежащего к группе, состоящей из *Corynebacter*, *Sutterella*, *Legionella*, *Treponema*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Flavivola*, *Flavobacterium*, *Sphaerochaeta*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Neisseria*, *Roseburia*, *Parvibaculum*, *Staphylococcus*, *Nitratifactor*, *Mycoplasma* и *Campylobacter*.
26. Композиция по любому из пп. 1-25 для применения в медицине или в терапии.
27. Композиция по любому из пп. 1-25 для применения в способе модификации

организма или отличного от человека организма путем манипуляции с целевой последовательностью в представляющем интерес локусе генома или в способе лечения или подавления состояния, вызванного дефектом в целевой последовательности в представляющем интерес локусе генома.

28. Применение композиции по любому из пп. 1-25 в редактировании гена или генома *ex vivo*.

29. Применение композиции по любому из пп. 1-25 в производстве лекарственного препарата для редактирования гена или генома *ex vivo* или для применения в способе модификации организма или отличного от человека организма путем манипуляции с целевой последовательностью в представляющем интерес локусе генома или в способе лечения или подавления состояния, вызванного дефектом в целевой последовательности в представляющем интерес локусе генома.

30. Композиция, содержащая:

А) - I. полинуклеотидную последовательность химерной РНК (chiRNA) системы CRISPR-CAS, где полинуклеотидная последовательность содержит:

(a) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке,

(b) парную *tracr*-последовательность и

(c) *tracr*-последовательность, и

II. полинуклеотидную последовательность, кодирующую фермент CRISPR, необязательно содержащий по меньшей мере одну или несколько последовательностей ядерной локализации,

где (a), (b) и (c) расположены в 5'-3' ориентации,

где при транскрипции парная *tracr*-последовательность гибридизуется с *tracr*-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, и

где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной *tracr*-последовательностью, которая гибридизуется с *tracr*-последовательностью, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая фермент CRISPR представляет собой ДНК или РНК,

или

(B) I. полинуклеотиды, содержащие:

(a) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке, и

(b) по меньшей мере одну или несколько парных *tracr*-последовательностей,

II. полинуклеотидную последовательность, кодирующую фермент CRISPR, и

III. полинуклеотидную последовательность, содержащую *tracr*-последовательность, где при транскрипции парная *tracr*-последовательность гибридизуется с *tracr*-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, и

где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной *tracr*-последовательностью, которая гибридизуется с *tracr*-последовательностью, и полинуклеотидная последовательность, кодирующая фермент CRISPR представляет собой ДНК или РНК;

для применения в медицине или терапии; или для применения в способе модификации организма или отличного от человека организма путем манипуляции с целевой

последовательностью в представляющем интерес локусе генома; или для применения в способе лечения или подавления состояния, вызванного дефектом в целевой последовательности в представляющем интерес локусе генома; или для применения в редактировании гена или генома *ex vivo*.

31. Композиция по п. 30, отличающаяся тем, что полинуклеотиды содержатся в векторной системе, содержащей один или несколько векторов.

(30) (продолжение):

US61/847,537 17.06.2013;

US61/836,123 17.06.2013;

US61/835,931 17.06.2013

R U 2 0 1 5 1 2 8 0 5 7 A

R U 2 0 1 5 1 2 8 0 5 7 A