

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047138**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |  |  |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента<br><b>2024.06.06</b> | (51) Int. Cl. <i>C12N 15/10</i> (2006.01)<br><i>C12N 15/113</i> (2010.01)<br><i>C12N 15/86</i> (2006.01)<br><i>C12N 15/90</i> (2006.01)<br><i>C12N 9/22</i> (2006.01)<br><i>A61K 45/06</i> (2006.01)<br><i>A61K 48/00</i> (2006.01)<br><i>A61P 35/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки<br><b>202190758</b>                      |  |
| (22) Дата подачи заявки<br><b>2019.09.11</b>               |  |

---

(54) **КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ГИБЕЛИ КЛЕТОК, ИМЕЮЩИХ МУТИРОВАННЫЙ ГЕН, И СПОСОБ ИНДУКЦИИ ГИБЕЛИ КЛЕТОК, ИМЕЮЩИХ МУТИРОВАННЫЙ ГЕН, С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМПОЗИЦИИ**

---

- |   |   |
|---|---|
| (31) <b>10-2018-0109214</b>   | (56) US-A1-20170145405  |
| (32) <b>2018.09.12</b>  | TANG, H. et al.: CRISPR/Cas-mediated genome editing to treat EGFR-mutant lung cancer: a personalized molecular surgical therapy. EMBO Molecular Medicine. 2016, vol .8, no. 2, pages 83-85, See abstract; page 84 and figure 1. |
| (33) <b>KR</b>  | WO-A1-2018009525  |
| (43) <b>2021.08.03</b>  | US-A1-20080038277   |
| (86) <b>PCT/KR2019/011866</b>   | US-A1-20170114413   |
| (87) <b>WO 2020/055187 2020.03.19</b>   | KR-A-10-20060135945   |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br><b>ИНСТИТЮТ ФОР БЕЙСИК<br/>САЙЕНС; УНИСТ (УЛЬСАН<br/>НЭШНЛ ИНСТИТЮТ ОФ<br/>САЙЕНС ЭНД ТЕКНОЛОДЖИ) (KR)</b> |   |
| (72) Изобретатель:<br><b>Мюнг Кёнджэ, Квон Тэджун, Пэк Ин-<br/>Джун, Ра Чжэ Сон, Сео Юри, Юн<br/>Сонмин (KR)</b>                                    |   |
| (74) Представитель:<br><b>Фелицына С.Б. (RU)</b>  |   |

- 
- (57) Изобретение относится к композиции для индукции гибели клеток с вариациями геномной последовательности, содержащей нуклеазу и расщепляющий агент, и к способу индукции гибели клеток с вариациями геномной последовательности.

**B1**

**047138**

**047138**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композиции для индукции гибели клеток с вариациями геномной последовательности, содержащей нуклеазу и расщепляющий агент, и к способу индукции гибели клеток с вариациями геномной последовательности.

### Уровень техники

Клетки, имеющие поврежденные гены или геномы, вызывают проблемы, связанные с выживанием или функциями организмов или их органов. Существуют различные способы селективной индукции гибели этих клеток. Однако большинство этих способов дополнительно вызывают повреждение нормальных клеток и поэтому не подходят для клинического применения.

Раковые клетки представляют собой наиболее типичные клетки, имеющими поврежденные гены или геномы, которые вызывают проблемы с выживанием или функциями организмов или их органов. Хотя повреждение происходит в очень небольшой части DNA, по сравнению с геномом человека, повреждение DNA протоонкогенов или генов-супрессоров в конечном итоге увеличивает вероятность возникновения рака (Molecular Cell Biology. 4<sup>th</sup> edition. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., et al., New York: W. H. Freeman; 2000, "Section 12.4 DNA Damage and Repair and Their Role in Carcinogenesis").

Исследования и анализ раковых мутаций считаются основным базисом для разработки терапевтических средств против рака. Например, можно разработать терапевтические агенты, нацеленные на определенные генетические мутации, и проверить корреляцию между профилями мутаций и реакцией на лекарственные средства путем исследований мутаций рака.

Рак вызывается накоплением генетических мутаций, которые наследуются через половые клетки или приобретаются в соматических клетках во время клеточного цикла. Изменения в этих онкогенах, генах-супрессорах опухолей и генах репарации DNA приводят к утрате клетками механизмов роста и регуляции и, таким образом, к развитию рака.

При раке, вызванном данным процессом, был обнаружен ряд явлений, при которых наблюдают встраивание новых последовательностей DNA, не обнаруживаемых в нормальных клетках (вставка: IN) или в которых наблюдают удаление части DNA нормальных клеток (делеция: Del). Специфическая вставка или делеция DNA (IN/DEL), встречающаяся в такой DNA раковых клеток, относится к последовательности DNA, которая не существует в нормальных клетках, поэтому ее можно применять в качестве мишени для дифференцированной атаки между нормальными клетками и раковыми клетками.

В то же время, двухцепочечный разрыв DNA (DSB) представляет собой одну из наиболее серьезных форм повреждения на клеточном уровне. Поврежденная DNA восстанавливается за счет негомологичного соединения концов и гомологичной рекомбинации, тогда как DNA, которая не может быть восстановлена, может привести к повреждению или перестройке генетической информации, вызывающих гибель клетки.

CRISPR/Cas представляет собой инструмент для редактирования генов с применением направляющей RNA, который способен вводить двухцепочечные (или одноцепочечные) разрывы в определенные положения генома путем сопоставления последовательности направляющей RNA с последовательностью геномной DNA с помощью индуцированной бактериями эндонуклеазы Cas9 (или мутантной нуклеазы) и направляющей RNA. Ожидается, что нокаут гена, опосредованный CRISPR/Cas, будет более эффективным, чем нокаут гена, опосредованный RNA-интерференцией, и что он будет представлять собой полезный экспериментальный инструмент для исследования функции генов.

В исследованиях сообщалось, что система CRISPR-Cas может работать в клетках млекопитающих, а способы редактирования генов, основанные на адаптивном иммунитете микроорганизмов, включают Cas9 (связанный с CRISPR белок 9: RNA-направляемый DNA-эндонуклеазный фермент) и направляющую RNA (gRNA). Направляющая RNA включает crRNA (CRISPR RNA) и tracrRNA (транскрибирующую crRNA, она связывается с Cas9 и направляет его к целевой геномной последовательности посредством спаривания оснований с целевой последовательностью с образованием двухцепочечного разрыва (DSB). Единственным критерием для определения последовательности-мишени служит наличие или отсутствие мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), а последовательность мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), различается в зависимости от белка Cas, который его распознает. Например, известно, что Cas9, полученный из *S. pyogenes*, представляет собой 5'-NGG-3' (где N представляет собой A, T, G или C); Cas9, полученный из *S. thermophilus*, представляет собой 5'-NNAGAAW-3' и Cas9, полученный из *S. jejuni*, представляет собой 5'-NNNNRYAC-3'. PAM можно применять для редактирования генов, поскольку последовательности расположены в геноме человека с регулярными интервалами.

Между тем, сообщалось, что систему CRISPR/Cas можно применять для лечения рака у человека (Oncotarget. 2016 Mar 15; 7(11):12305-17). Однако это предполагает, что модификация или делеция одной или нескольких частей генома может увеличить вероятность предоставления эффективных терапевтических средств против рака, основанных на множестве генетических мутаций, которые коррелируют с возникновением рака.

Исходя из данного технического уровня, авторы настоящего изобретения обнаружили, что клетки, имеющие вариации геномной последовательности, такие как раковые клетки, имеют присущие им последовательности In/Del, а также обнаружили, что это позволяет индуцировать гибель клеток, имеющих

вариации геномной последовательности из-за множества DSB (двухцепочечных разрывов) DNA в определенном участке DNA клеток, которые возникают под действием расщепляющего агента (расщепляющих агентов) и нуклеазы, продуцируемой на основе последовательностей In/Del, так что настоящее изобретение было выполнено на основе этого открытия.

### **Раскрытие изобретения**

#### **Техническая задача**

Таким образом, настоящее изобретение было создано с учетом вышеупомянутых задач, и одна из целей настоящего изобретения заключается в обеспечении композиции для индукции гибели клеток с вариациями геномной последовательности, содержащей нуклеазу и расщепляющий агент.

Другая цель настоящего изобретения заключается в обеспечении композиции для лечения рака, содержащей нуклеазу и расщепляющий агент.

Другая цель настоящего изобретения заключается в обеспечении способа индукции гибели клеток, имеющих вариации геномной последовательности, включающие нуклеазу и расщепляющий агент.

Другая цель настоящего изобретения заключается в обеспечении способа лечения рака с применением нуклеазы и расщепляющего агента.

#### **Техническое решение**

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения вышеуказанные и другие цели могут быть достигнуты путем обеспечения композиции для индукции гибели клеток, имеющих вариации геномной последовательности, содержащей нуклеазу и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности.

В соответствии с другим аспектом обеспечивают композицию для лечения рака, содержащую нуклеазу и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для рака.

В соответствии с другим аспектом обеспечивают способ индукции гибели клеток, имеющих вариации геномной последовательности, включающий обработку клеток, имеющих вариации геномной последовательности, нуклеазой и расщепляющим агентом, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности.

В соответствии с другим аспектом обеспечивают способ индукции гибели клеток, имеющих вариации геномной последовательности, включающий

выполнение полногеномного секвенирования (WGS) на клетках, имеющих вариации геномной последовательности, и нормальных клетках;

сравнение полученных данных WGS между клетками, имеющими вариации геномной последовательности, и нормальными клетками для выбора мутантной последовательности, специфичной для клеток, имеющих вариации геномной последовательности;

получение расщепляющего агента, распознающего выбранную мутантную последовательность;

получение композиции, включающей расщепляющий агент и нуклеазу; и

применение композиции на клетках, имеющих вариации геномной последовательности.

В соответствии с другим аспектом обеспечивают способ индукции гибели клеток, имеющих вариации геномной последовательности, включающий

выполнение полногеномного секвенирования (WGS) на клетках, имеющих вариации геномной последовательности, и нормальных клетках;

сравнение полученных данных WGS между клетками, имеющими вариации геномной последовательности, и нормальными клетками для выбора In/Del, специфичных для клеток, имеющих вариации геномной последовательности;

получение расщепляющего агента, распознающего выбранные In/Del;

получение композиции, включающей расщепляющий агент и нуклеазу; и

применение композиции, включающей нуклеазу и расщепляющий агент, на клетки, имеющие вариации геномной последовательности.

В соответствии с другим аспектом обеспечивают способ лечения рака, включающий введение субъекту нуклеазы и расщепляющего агента, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, и нуклеазу.

В соответствии с другим аспектом обеспечивают способ лечения рака, включающий обработку клеток, имеющих вариации геномной последовательности, вектором, включающим кассету экспрессии расщепляющего агента, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, и нуклеазу.

В соответствии с другим аспектом обеспечивают композицию для специфической для пациента терапии рака, включающую нуклеазу и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для раковых

клеток пациента.

В соответствии с другим аспектом, обеспечивают специфическую для пациента терапию рака, включающую отбор In/Del, специфичных для раковых клеток, из раковых клеток пациента; получение расщепляющего агента, распознающего In/Del; и доставку пациенту композиции, включающей нуклеазу и расщепляющий агент.

#### Описание чертежей

Фиг. 1 показывает результат обнаружения того, индуцируется ли клеточная гибель, если одновременно происходит множество DSB (двухцепочечных разрывов) DNA;

фиг. 2 показывает результат обнаружения того, расщепляется ли DNA системой CRIPSR с применением направляющей RNA;

фиг. 3 показывает рост клеток, обнаруженный с помощью анализа образования колоний после трансфекции 30 специфических комплексов RNP (рибонуклеотидный белок) в клетки колоректального рака и клетки остеосаркомы для индукции DSB DNA;

фиг. 4 показывает клеточную инфекцию AAV, измеренную с помощью иммунофлуоресценции и проточной цитометрии;

фиг. 5 показывает результат обнаружения трансфекции частиц AAV с помощью иммунофлуоресценции;

фиг. 6 показывает U2OS-специфическую crRNA-зависимую гибель клеток, детектированную с применением 30 crRNA, специфичных для линии U2OS-клеток;

фиг. 7 показывает результаты обнаружения того, работает ли система saCAS9 AAV, специфичная для клеток U2OS, и происходит ли гибель клеток в клетках U2OS;

фиг. 8 показывает жизнеспособность клеток (%), измеренную на основании гибели клеток с помощью специфичного для рака In/Del;

фиг. 9 показывает результат обнаружения того, индуцируется ли AAV-зависимая гибель клеток только в линиях клеток, специфичных для crRNA;

фиг. 10 показывает результат обнаружения того, происходит ли селективная гибель раковых клеток в глиобластоме;

фиг. 11 показывает результат обнаружения разницы в гибели клеток между применением частиц AAV, содержащих ингибитор киназы ATM, и применением частиц AAV, не содержащих ингибитор киназы ATM; и

фиг. 12 показывает результат обнаружения эффекта специфической для рака легких гибели клеток, индуцированной In/Del (CINDELA).

#### Наилучший способ осуществления изобретения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют те же значения, которые понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В общем, применяемая здесь номенклатура хорошо известна в данной области техники, и ее применяют обычным образом.

В одном из аспектов настоящее изобретение направлено на композицию для индукции гибели клеток с вариациями геномной последовательности, включающую нуклеазу и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на композицию для лечения рака, содержащую нуклеазу и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для рака.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ индуцирования гибели клеток с вариациями геномной последовательности, включающий обработку клеток с вариациями геномной последовательности нуклеазой и расщепляющим агентом, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности.

Как применен в настоящем документе, термин "клетки, имеющие вариации геномной последовательности" (также называемые "мутантные клетки" или "клетки, имеющие генетические мутации") относится к клеткам, которым с помощью генетических мутаций придают активность, отличную от активности нормальных клеток, и может, например, относиться к клеткам, находящимся в состоянии начала заболевания из-за генетических мутаций, конкретно, к раковым клеткам.

Рак представляет собой, например, меланому, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, глиому, рак печени, опухоль щитовидной железы, рак желудка, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак легких, колоректальный рак, рак молочной железы, рак простаты, глиобластому, рак эндометрия, рак почки, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, карциному пищевода, рак головы и шеи, мезотелиому, саркому, остеосаркому, рак желчных протоков или рак эпидермиса, но не ограничивается ими.

Феномен, при котором вставляется новая последовательность DNA, не обнаруженная в нормальных клетках, называемый "вставкой" (IN), или при котором часть DNA нормальных клеток удаляется, назы-

ваемый "делецией" (Del), наблюдают в раковых клетках, и в них может присутствовать последовательность DNA, специально вставленная или удаленная из соответствующих раковых клеток.

Клетки имеют механизм восстановления повреждений DNA для восстановления повреждений DNA, когда в клетках происходит DSB (двухцепочечный разрыв) DNA. Однако механизм репарации повреждений DNA эффективно восстанавливает повреждение DNA, когда количество двухцепочечных разрывов невелико, но вызывает гибель, когда количество двухцепочечных разрывов велико. Бактерии могут быть уничтожены за счет одного двухцепочечного разрыва, но для того, чтобы вызвать гибель животных клеток, требуется больше множественных DSB.

Согласно настоящему изобретению на основании фактов, описанных выше, авторы изобретения обнаружили несколько In/Del в клетках, имеющих вариации геномной последовательности, например, в раковых клетках, и получили множественные расщепляющие агенты, способные распознавать множественные In/Del, и, наконец, индуцировали специфическую гибель клеток, имеющих вариации геномной последовательности, например, раковых клеток, с применением нуклеазы и множественных расщепляющих агентов.

Нуклеаза, которая представляет собой средство достижения двухцепочечного разрыва DNA, может представлять собой рестрикционный фермент, нуклеазу цинкового пальца (ZNFN), эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), или белок Cas, или нуклеиновую кислоту, кодирующую то же самое, но не ограничивается ими. Белок Cas может представлять собой Cas3, Cas9, Cpf1 (CRISPR от *Prevotella* и *Francisella* 1), Cas6, C2c12 или C2c2, но не ограничивается ими.

Белок Cas может происходить из рода микроорганизмов, содержащих ортолог белка Cas, выбранного из группы, состоящей из

*Corynebacter*, *Sutterella*, *Legionella*,

*Treponema*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*), *Lactobacillus*,

*Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Flavivivola*, *Flavobacterium*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*,

*Neisseria*, *Roseburia*, *Parvibaculum*, *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*), *Nitratifactor*,

*Corynebacterium* and *Campylobacter*,

и белок Cas выделяют из них или получают с помощью рекомбинации.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ индукции гибели клеток, имеющих вариации геномной последовательности, включающий: выполнение полногеномного секвенирования (WGS) на клетках, имеющих вариации геномной последовательности, и нормальных клетках; сравнение полученных данных WGS между клетками, имеющими вариации геномной последовательности, и нормальными клетками, для отбора мутантной последовательности, специфичной для клеток, имеющих вариации геномной последовательности; получение расщепляющего агента, распознающего выбранную мутантную последовательность; получение композиции, включающей расщепляющий агент и нуклеазу; и применение композиции на клетках, имеющих вариации геномной последовательности.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ индукции гибели клеток, имеющих вариации геномной последовательности, включающий: выполнение полногеномного секвенирования (WGS) на клетках, имеющих вариации геномной последовательности, например, раковых клетках и нормальных клетках; сравнение полученных данных WGS между клетками, имеющими вариации геномной последовательности, и нормальными клетками для выбора нескольких In/Del, специфичных для клеток, имеющих вариации геномной последовательности; получение расщепляющего агента, распознающего выбранные In/Del; получение композиции, включающей расщепляющий агент и нуклеазу; и применение композиции, включающей нуклеазу и расщепляющий агент, на клетках, имеющих вариации геномной последовательности.

Картирование In/Del, которые представляют собой мишень для расщепляющего агента, может быть выполнено с помощью WGS (полногеномного секвенирования) или вычитающей гибридизации и секвенирования. В случае, когда полученная In/Del представляет собой вставку, обнаруженную при раке, направляющую RNA получают немедленно, а в случае, когда полученная In/Del представляет собой делецию, обнаруженную при раке, картируют точку разрыва, а затем создают направляющую РНК, включающую точку разрыва.

Как применен в настоящем документе, термин "WGS (полногеномное секвенирование)" относится к способу считывания генома с разной глубиной 10 ×, 20 × и 40 × с применением полноразмерных последовательностей генома посредством секвенирования следующего поколения. Как применен в настоящем документе, термин "секвенирование следующего поколения" относится к технологии, которая включает фрагментирование полноразмерного генома в формате парных концов на основе чипа и на основе ПЦП и секвенирование фрагмента с очень высокой скоростью на основе химической гибридизации.

Вычитающая гибридизация - это способ, применяемый для клонирования генов с различиями в экспрессии между несколькими тканями или клетками. Могут быть обнаружены гены, специфичные для образца DNA исследуемых клеток. DNA тестируемых клеток модифицируют в одноцепочечную DNA, а затем отжигают. Регулируя условия отжига, последовательность DNA, специфичная для исследуемых

клеток, может быть разделена на двухцепочечную DNA.

Последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для раковых клеток, которые представляют собой тип клетки, имеющей генетическую мутацию, например, может содержать сайт гена, где DSB DNA индуцируется в последовательности нуклеиновой кислоты нуклеазой, нацеленной на In/Del, и последовательность в последовательности нуклеиновой кислоты, которая специфически распознается нуклеазой, например, последовательность нуклеиновой кислоты, имеющая длину примерно от 17 до 23 п.о., рядом с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности PAM, распознаваемой белком Cas9, если нуклеаза представляет собой Cas9.

Последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для раковых клеток, которые представляют собой клетки, имеющие вариации геномной последовательности, представлена последовательностью нуклеиновой кислоты цепи, в которой расположена последовательность PAM, между двумя цепями DNA соответствующего участка последовательности. В этом случае, поскольку цепь DNA, с которой фактически связывается направляющая RNA, представляет собой цепь, комплементарную цепи, в которой расположена последовательность PAM, нацеливающая последовательность, включенная в направляющую RNA, имеет ту же последовательность нуклеиновой кислоты, что и последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, за исключением того, что T изменен на U из-за характеристик RNA.

Если белок Cas9 происходит из *Streptococcus pyogenes*, то последовательность PAM может представлять собой 5'-NGG-3' (где N представляет собой A, T, G или C), а последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, может представлять собой сайт гена, расположенный рядом с 5'-концом и/или 3'-концом 5'-NGG-3' последовательности в последовательности, например, сайт гена, имеющий максимальную длину примерно 50 п.о. или примерно 40 п.о.

Если белок Cas9 происходит из *Streptococcus thermophilus*, то последовательность PAM может представлять собой 5'-NNAGAAW-3' (где N представляет собой A, T, G или C), а последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, может представлять собой сайт гена, расположенный рядом с 5'-концом и/или 3'-концом 5'-NNAGAAW-3' последовательности в последовательности, например, сайт гена, имеющий максимальную длину примерно 50 п.о. или примерно 40 п.о.

Если белок Cas9 происходит из *Staphylococcus aureus*, то последовательность PAM может представлять собой 5'-NNGRRT-3' (где N представляет собой A, T, G или C и R представляет собой A или G), а последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, может представлять собой сайт гена, расположенный рядом с 5'-концом и/или 3'-концом 5'-NNGRRT-3' последовательности в последовательности, например, сайт гена, имеющий максимальную длину примерно 50 п.о. или примерно 40 п.о.

Если белок Cas9 происходит из *Campylobacter jejuni*, то последовательность PAM может представлять собой 5'-NNNNRYAC-3' (где N представляет собой A, T, G или C, R представляет собой A или G, и Y представляет собой C или T), а последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, может представлять собой сайт гена, расположенный рядом с 5'-концом и/или 3'-концом 5'-NNNNRYAC-3' последовательности в последовательности, например, сайт гена, имеющий максимальную длину примерно 50 п.о. или примерно 40 п.о.

Как применен в настоящем документе, термин "расщепляющий агент" относится к нуклеотидной последовательности, которая позволяет распознавать и расщеплять модифицированную и измененную часть последовательности нуклеиновой кислоты клетки, имеющей вариации геномной последовательности по сравнению с нормальной клеткой.

Примененный в настоящем документе расщепляющий агент должен присутствовать множественном числе с различными последовательностями, достаточными для индукции гибели клеток по сравнению с нуклеотидной последовательностью нормальных клеток, предпочтительно от 1 до 30, более предпочтительно от 10 до 30 и еще более предпочтительно от 16 до 30, но их количество может варьировать в зависимости от типа клеток или расщепляющих агентов.

Расщепляющий агент, который специфично распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, например, раковых клеток, может представлять собой, например, направляющую RNA. Направляющая RNA может, например, включать по меньшей мере одну RNA, выбранную из группы, состоящей из CRISPR RNA (crRNA), транскрибирующей crRNA (tracrRNA) и одиночной направляющей RNA (sgRNA), в особенности, двухцепочечный комплекс crRNA:tracrRNA, включающий crRNA и tracrRNA, связанные друг с другом, или одноцепочечную направляющую RNA (sgRNA), имеющую crRNA или ее часть и tracrRNA или ее часть, связанные друг с другом олигонуклеотидным линкером.

Направляющая RNA, которая специфично распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, охватывает нуклеотидную последовательность, имеющую комплементарность последовательности по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100% с нуклеотидной последовательностью цепи, комплементарной цепи DNA, в которой расположена последовательность PAM и может быть связана с нуклеотидной последовательностью комплементарной цепи.

Направляющая RNA может быть получена с помощью следующих шагов: сравнение полученных данных WGS между раковыми клетками и нормальными клетками для выбора In/Del, специфичных для раковых клеток, разработка специфичных для раковых клеток направляющей (направляющих) RNA, которая удовлетворяет (которые удовлетворяют) условиям получения направляющей RNA на основе In/Del, а затем установление произвольного порядка с учетом длины сайта In/Del и создание направляющей RNA однородно на всех хромосомах для завершения окончательной комбинации направляющих RNA.

Условия для получения направляющей RNA были следующими: (a) длина нуклеотидной последовательности направляющей RNA, исключая сайт PAM, составляла 20 пар оснований; (b) общая доля гуанина и цитозина, присутствовавших в направляющей RNA, составляла от 40 до 60%; (c) In/Del была расположена в непосредственной близости от сайта PAM; (d) максимальная длина гомополимера составляла 4 пары оснований или меньше и (e) выполняли картирование, которое допускает одно несовпадение с результирующими данными WGS для нормальных клеток, не должно быть результата картирования.

Полученная на основании этого направляющая RNA может, например, включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: от 1 до 163. Количество направляющих RNA, способных вызывать гибель раковых клеток, может быть множественным с различными последовательностями, в особенности от примерно 1 до примерно 40, от примерно 15 до примерно 25 или от примерно 10 до примерно 20. Направляющая RNA может, например, включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-30, по меньшей мере, одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-60, по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61-90, по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 91-120, по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121-136, и по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 137-163.

В одном из воплощений рак может представлять собой колоректальный рак и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для колоректального рака, может представлять собой направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NO: от 1 до 30.

В одном из воплощений, рак может представлять собой остеосаркому, и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для остеосаркомы может представлять собой направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 31-60, или направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 91-120.

В одном из воплощений расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для нормальных клеток, может представлять собой направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 61-90.

В одном из воплощений рак может представлять собой глиобластому, и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для глиобластомы может представлять собой, например, направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 121-136.

В одном из воплощений рак может представлять собой рак легких и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для рака легких, может представлять собой направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 137-163.

Согласно воплощению настоящего изобретения специфические для рака In/Del идентифицировали в клетках каждой из клеточной линии колоректального рака HCT116, клеточной линии остеосаркомы U2OS, клеточной линии глиобластомы GBL-67, ткани рака легких и клеточной линии REP1, полученной путем иммортализации нормальных клеток, направляющую RNA, которая специфически распознает специфичные для рака In/Del, получали для индукции DSB DNA, а затем наблюдали за ростом клеток. Конкретно, направляющая RNA, которая специфически распознает In/Del линии клеток колоректального рака HCT116, включает по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: от 1 до 30, и направляющая RNA, которая специфически распознает In/Del клеточной линии остеосаркомы U20S, включает по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31-60 или SEQ ID NO: 91-120, направляющая RNA, которая специфически распознает In/Del клеточной линии глиобластомы, включает по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121-136, направляющая RNA, которая специфически распознает In/Del клеточной линии рака легких, включает по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 137-163, и направляющая RNA, которая специфически распознает In/Del нормальной клеточной линии REP1, включает по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61-90.

Специфические для клеточной линии In/Del обнаруживают посредством трансляции всего генома (WGS), а затем конструируют направляющую RNA для включения в область сайта PAM, которая прочно связывается с соответствующей областью. Следует подтвердить, что разработанная направляющая RNA не вызывает неспецифического ответа на нормальный стандартный геном человека. Затем определяют произвольный порядок с учетом длины сайта In/Del, и направляющие RNA конструируют так, чтобы равномерно распределить по всем хромосомам в зависимости от порядка, чтобы тем самым завершить окончательные комбинации нескольких направляющих RNA. Хотя в данном воплощении применяли 30 направляющих RNA, количество направляющих RNA можно регулировать в зависимости от типа раковых клеток и экспериментального способа, с помощью которого вызывают DSB.

Нуклеаза и расщепляющий агент, например направляющая RNA, согласно настоящему изобретению, могут быть доставлены в клетки в форме (а) множества направляющих RNA с разными последовательностями и вектора, включающего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, например Cas белок, (b) рибонуклеопротеина (RNP) или RNA-направляемой инженерной нуклеазы (RGEN), содержащей несколько направляющих RNA с разными последовательностями, и нуклеазу, например, белок Cas или (с) по меньшей мере одну направляющую RNA и mRNA, кодирующую нуклеазу, например, белок Cas, но не ограничиваясь ими.

В одном из воплощений, вектор может представлять собой вирусный вектор. Вирусный вектор может быть выбран из RNA-содержащих вирусов с отрицательной цепью, таких как ретровирус, аденовирус-парвовирус (например, аденоассоциированный вирус (AAV)), коронавирус и ортомиксовирус (например, вирус гриппа), RNA-содержащих вирусов с положительной цепью, таких как рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, кори и Сендай), альфавирус и пикорнавирус, вирусов с двухцепочечной DNA, включая вирус герпеса (например, вирус простого герпеса 1 и 2, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус) и аденовируса, поксвируса (например, коревой оспы, птичьей оспы или оспы канареек) и т.п.

Вектор может быть доставлен *in vivo* или в клетки посредством электропорации, липофекции, вирусных векторов или наночастиц, а также способами слияния белков с PTD (доменом транслокации белка).

В некоторых случаях, например, по меньшей мере, один ингибитор ATM (мутантный при атаксии-телеангиэктазии), выбранный из группы, состоящей из кофеина, вортманнина, CP-466722, KU-55933, KU-60019 и KU-559403, по меньшей мере один ингибитор ATR (мутантный при атаксии-телеангиэктазии и Rad-3), выбранный из группы, состоящей из схизандрина B, NU6027, NVP-BEZ235, VE-821, VE-822 (VX-970), AZ20 и AZD6738, или ингибитора двухцепочечной репарации DNA DNA-PKcs (каталитическая субъединица DNA-зависимой протеинкиназы) может быть дополнительно включен для ингибирования репарации двухцепочечной DNA с целью повышения эффективности гибели клеток за счет двухцепочечного разрыва DNA.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на композицию для лечения рака, включающую нуклеазу и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для рака. В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ лечения рака, включающий введение субъекту нуклеазы и расщепляющего агента, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для рака.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на композицию для лечения рака, специфичную для пациента, включающую нуклеазу и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для раковых клеток пациента.

Как применен в настоящем документе, термин "рак, специфичный для пациента" означает, что врожденные свойства пациента или свойства болезни пациента полностью учитывают для эффективного лечения рака. Композиция для лечения рака, специфичного для пациента, может быть успешно применена при выборе терапевтических средств и способов.

Как применен в настоящем документе, термин "клетки, имеющие вариации геномной последовательности" относится к клеткам, которые наделены активностью, отличной от активности нормальных клеток, путем генетической модификации, и может, например, относиться к клеткам, которые находятся в состоянии начала заболевания из-за генетической мутации, в особенности к раковым клеткам.



Рак представляет собой, например, меланому, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, глиому, рак печени, опухоль щитовидной железы, рак желудка, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак легких, колоректальный рак, рак молочной железы, рак простаты, глиобластома, рак эндометрия, рак почки, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, мезотелиому, саркому, остеосаркому, рак желчных протоков или рак эпидермиса, но не ограничивается ими.

В раковых клетках наблюдают явление, при котором вставляется новая последовательность DNA, не обнаруженная в нормальных клетках, называемое "вставкой" (IN), или при котором часть DNA нормальных клеток удаляется, называемое "делецией (Del)", и в них может присутствовать последовательность DNA, специально вставленная или удаленная из соответствующих раковых клеток.

Клетки имеют механизм восстановления поврежденных DNA для восстановления поврежденных DNA, когда в клетках происходит DSB (двухцепочечный разрыв) DNA. Однако механизм репарации поврежденных DNA тогда эффективно восстанавливает повреждение DNA, когда количество двухцепочечных разрывов мало, но вызывает смерть, если количество двухцепочечных разрывов велико. Бактерии могут быть убиты одним двухцепочечным разрывом, но требуется больше множественных DSB, чтобы вызвать гибель животных клеток.

Согласно настоящему изобретению на основании фактов, описанных выше, авторы настоящего изобретения обнаружили несколько In/Del в клетках, имеющих вариации геномной последовательности, например в раковых клетках, и продуцировали несколько расщепляющих агентов, способных распознавать несколько In/Del, и, наконец, индуцировали специфическую гибель клеток, имеющих вариации геномной последовательности, например, раковых клеток, применяя нуклеазу и несколько расщепляющих агентов.

Нуклеаза, которая представляет собой средство достижения двухцепочечного разрыва DNA, может быть рестрикционным ферментом, нуклеазой цинкового пальца (ZNFN), эффекторной нуклеазой, подобной активатору транскрипции (TALEN), или белком Cas или нуклеиновой кислотой, кодирующей то же самое, но не ограничивается ими. Белок Cas может представлять собой Cas3, Cas9, Crp1 (CRISPR от *Prevotella* и *Francisella* 1), Cas6, C2c12 или C2c2, но не ограничивается ими.

Белок Cas может происходить из рода микроорганизмов, содержащих ортолог белка Cas, который выбирают из группы, состоящей из

*Corynebacter*, *Sutterella*, *Legionella*,

*Treponema*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*), *Lactobacillus*,

*Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Flaviivola*, *Flavobacterium*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*,

*Neisseria*, *Roseburia*, *Parvibaculum*, *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*), *Nitratifactor*,

*Corynebacterium* и *Campylobacter*,

и белок Cas выделяют из них или получают с помощью рекомбинации.

Последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для раковых клеток, которые представляют собой тип клеток, имеющих генетические мутации, например, может включать участок гена, в котором DSB DNA индуцируют в последовательности нуклеиновой кислоты нуклеазой, нацеленной на In/Del, и последовательность в последовательности нуклеиновой кислоты, которая специфически распознается нуклеазой, например, последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую длину примерно от 17 до 23 пар оснований, рядом с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности PAM, распознаваемой белком Cas9, если нуклеаза представляет собой Cas9.

Последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для раковых клеток, которые представляют собой клетки, имеющие вариации геномной последовательности, представлена последовательностью нуклеиновой кислоты цепи, в которой расположена последовательность PAM, между двумя цепями DNA соответствующего участка последовательности. В этом случае, поскольку цепь DNA, с которой фактически связывается направляющая RNA, представляет собой цепь, комплементарную цепи, в которой расположена последовательность PAM, то нацеливающая последовательность, включенная в направляющую RNA, имеет ту же последовательность нуклеиновой кислоты, что и последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, за исключением того, что Т изменен на U из-за характеристик RNA.

Если белок Cas9 происходит из *Streptococcus pyogenes*, то последовательность PAM может представлять собой 5'-NGG-3' (где N представляет собой A, T, G или C), а последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, может представлять собой сайт гена, расположенный рядом с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NGG-3' в последовательности, например, сайт гена, имеющий максимальную длину примерно 50 п.о. или примерно 40 п.о.

Если белок Cas9 происходит из *Streptococcus thermophilus*, то последовательность PAM может представлять собой 5'-NNAGAAW-3' (где N представляет собой A, T, G или C), а последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, может представлять собой сайт гена, расположенный рядом с 5'-концом и/или 3'-

концом 5'-NNAGAAW-3' последовательности в последовательности, например, сайт гена, имеющий максимальную длину примерно 50 п.о. или примерно 40 п.о.

Если белок Cas9 происходит из *Staphylococcus aureus*, то последовательность PAM может представлять собой 5'-NNGRRT-3' (где N представляет собой A, T, G или C и R представляет собой A или G), а последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, может представлять собой сайт гена, расположенный рядом с 5'-концом и/или 3'-концом 5'-NNAGAAW-3' последовательности в последовательности, например, сайт гена, имеющий максимальную длину примерно 50 п.о. или примерно 40 п.о.

Если белок Cas9 происходит из *Campylobacter jejuni*, то последовательность PAM может представлять собой 5'-NNNNRYAC-3' (где N представляет собой A, T, G или C, R представляет собой A или G, и Y представляет собой C или T), а последовательность нуклеиновой кислоты, включающая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, может представлять собой сайт гена, расположенный рядом с 5'-концом и/или 3'-концом of the 5'-NNNNRYAC-3' последовательности в последовательности, например сайт гена, имеющий максимальную длину примерно 50 п.о. или примерно 40 п.о.

Как применен в настоящем документе, термин "расщепляющий агент" относится к нуклеотидной последовательности, которая позволяет распознавать и расщеплять модифицированную и измененную часть последовательности нуклеиновой кислоты клетки, имеющей вариации геномной последовательности по сравнению с нормальной клеткой.

Расщепляющий агент, примененный в настоящем документе, должен присутствовать во множественном числе с различными последовательностями, достаточными для индукции гибели клеток по сравнению с нуклеотидной последовательностью нормальных клеток, предпочтительно от 1 до 30, более предпочтительно, от 10 до 30 и, еще более предпочтительно, от 16 до 30, но их количество можно варьировать в зависимости от типа клеток или расщепляющих агентов.

Расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включая In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, например, раковых клеток, может представлять собой, например, направляющую RNA. Направляющая RNA может, например, включать по меньшей мере одну RNA, выбранную из группы, состоящей из CRISPR RNA (crRNA), транс-активирующей crRNA (tracrRNA) и одиночной направляющей RNA (sgRNA), в особенности, двухцепочечный комплекс crRNA:tracrRNA, включающий связанные друг с другом crRNA и tracrRNA, или одиночной направляющей RNA (sgRNA), имеющей crRNA или ее часть и tracrRNA или ее часть, связанные друг с другом с помощью олигонуклеотидного линкера.

Направляющая RNA, которая специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую In/Del, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, означает нуклеотидную последовательность, имеющую комплементарность последовательности, равную по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99 или 100%, с нуклеотидной последовательностью цепи, комплементарной цепи DNA, в которой расположена последовательность PAM, и может быть связана с нуклеотидной последовательностью комплементарной цепи.

Направляющая RNA может быть произведена посредством следующих этапов: сравнение полученных данных WGS между раковыми клетками и нормальными клетками для выбора In/Del, специфичных для раковых клеток, разработка специфичной для раковых клеток направляющей RNA, которая удовлетворяет условиям продукции направляющей RNA на основе на In/Del, а затем установка произвольного порядка с учетом длины сайта In/Del и конструирование направляющей RNA однородно на всех хромосомах, чтобы завершить окончательную комбинацию направляющих RNA.

Условия для продукции направляющей RNA следующие: (a) длина нуклеотидной последовательности направляющей RNA, исключая сайт PAM, составляет 20 пар оснований; (b) общая доля гуанина и цитозина, присутствующих в направляющей RNA, составляет от 40 до 60%; (c) In/Del существует в непосредственной близости от участка PAM; (d) максимальная длина гомополимера составляет 4 пары оснований или меньше и (e) выполняют картирование, которое допускает одно несовпадение с результирующими данными WGS для нормальных клеток, результата картирования быть не должно.

Направляющая RNA, полученная на их основе, может, например, включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 1-163. Количество направляющих RNA, способных вызывать гибель раковых клеток, может быть множественным с различными последовательностями, в особенности от примерно 1 до примерно 40, от примерно 15 до примерно 25 или от примерно 10 до примерно 20. Направляющая RNA может, например, включать по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 1-30, по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 31-60, по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 61-90, по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 91-120, по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 121-136, и по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 137-163.

В одном из воплощений рак может представлять собой колоректальный рак, и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для колоректального рака, может представлять собой направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 1-30.

В одном из воплощений рак может представлять собой остеосаркому, и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для остеосаркомы, может представлять собой направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 31-60, или направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 91-120.

В одном из воплощений расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающей вставку и/или делецию, специфичную для нормальных клеток, может представлять собой направляющую RNA, включающую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 61-90.

В одном из воплощений, рак может представлять собой глиобластому, и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для глиобластомы может представлять собой, например, направляющую RNA, включающую, по меньшей мере, одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 121-136.

В одном из воплощений рак может представлять собой рак легких, и расщепляющий агент, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую вставку и/или делецию, специфичную для рака, легких может представлять собой направляющую RNA, включающую, по меньшей мере, одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных SEQ ID NOS: 137-163.

Нуклеаза и расщепляющий агент, например направляющая RNA согласно настоящему изобретению, может быть доставлен в клетки в форме (а) множества направляющих RNA с различными последовательностями и вектором, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеазу, например, белок Cas, (b) рибонуклеопротеина (RNP) или направляемой RNA сконструированной нуклеазы (RGEN), включающей множество направляющих RNA с разными последовательностями и нуклеазой, например белком Cas, или (с) по меньшей мере, одной направляющей RNA и нуклеазой, кодируемой mRNA, например, белком Cas, но не ограничивается ими.

В одном из воплощений, вектор может представлять собой вирусный вектор. Вирусный вектор может быть выбран из RNA-содержащих вирусов с отрицательной цепью, таких как ретровирус, аденовирус-парвовирус (например, аденоассоциированный вирус (AAV)), коронавирусы и ортомиксовирус (например, вирус гриппа), RNA-содержащих вирусов с положительной цепью, таких как рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, корь и Сендай), альфа-вирус и пикорнавирус, двухцепочечных DNA-вирусов, включая вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус) и аденовируса, поксвируса (например, коровья оспа, птичья оспа или оспа канареек) и тому подобного.

Вектор может быть доставлен *in vivo* или в клетки посредством электропорации, липофекции, вирусных векторов или наночастиц, а также способами слияния белков с PTD (доменом транслокации белка).

В некоторых случаях, ингибитор двухцепочечной репарации DNA, например, по меньшей мере один ингибитор ATM (мутантный при атаксии-телангиэктазии), выбранный из группы, состоящей из кофеина, вортманнина, CP-466722, KU-55933, KU-60019 и KU-559403, по меньшей мере один ингибитор ATR (мутантный при атаксии-телангиэктазии белок и Rad-3), выбранный из группы, состоящей из схизандрина B, NU6027, NVP-BEZ235, VE-821, VE-822 (VX-970), AZ20 и AZD6738, или ингибитора двухцепочечной репарации DNA DNA-PKcs (каталитическая субъединица DNA-зависимой протеинкиназы) может быть дополнительно включен для ингибирования репарации двухцепочечной DNA с целью повышения эффективности гибели клеток за счет двухцепочечного разрыва DNA.

Более того, в другом аспекте настоящее изобретение направлено на терапию рака, специфичную для пациента, включающую отбор In/Del, специфичных для раковых клеток, из раковых клеток пациента; получение расщепляющего агента, распознающего In/Del; и доставку пациенту композиции, включающей нуклеазу и расщепляющий агент.

Композиции, способы и применение настоящего изобретения могут быть применены у субъекта, нуждающегося в этом, в достаточном количестве или в эффективном количестве. Термин "эффективное количество" или "достаточное количество" представляет собой количество, вводимое в одной или нескольких дозах по отдельности или в комбинации по меньшей мере с одной другой терапевтической композицией, протоколом или схемой лечения, которые приносят пользу субъекту в течение любого периода времени или обеспечивают субъекта ожидаемым или желаемым результатом. Назначенное коли-

чество можно варьировать в зависимости от таких факторов, как способ приготовления, способ введения, возраст, вес, пол и патологическое состояние пациента, время введения, способ введения, скорость выведения и чувствительность ответа.

Вектор, такой как вирусный вектор, плазмидный вектор или вектор агробактерий, содержащий каскету экспрессии расщепляющего агента, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включая вставку и/или делецию, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности, например раковых клеток, и нуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую ее, можно применять для доставки. В особенности, в качестве вирусного вектора для доставки может применяться вектор AAV (аденоассоциированный вирус).

Дозировка вектора AAV, подходящая для достижения терапевтического эффекта, может быть обеспечена как доза генома вектора/масса тела (об/кг) и может варьировать в зависимости от таких факторов, как: (а) путь введения, (b) уровень экспрессии терапевтический ген, необходимый для достижения терапевтического эффекта, (с) любой иммунный ответ хозяина на вектор AAV и (d) стабильность экспрессированного белка.

### Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Однако для специалистов в данной области техники будет очевидно, что эти примеры предоставлены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

#### Пример 1. Детекция эффекта гибели клеток с помощью DSB

Принимая во внимание тот факт, что множество DSB могут вызывать гибель клеток и что все раковые клетки имеют свои собственные последовательности In/Del, уникальные последовательности In/Del клеток HCT116, U2OS и REP1 идентифицировали с помощью WGS (полногеномное секвенирование). Затем, как показано ниже в табл. 1-3, среди уникальных последовательностей вставок в DNA раковых клеток были отобраны 30 последовательностей областей с размером вставки от 6 до 8 п.о., равномерно распределенных по хромосоме, для получения sgRNA для каждой линии клеток, клетки трансфицировали комплексом CRISPR RNP, после чего наблюдали специфичность sgRNA и жизнеспособность клеток.

Таблица 1

SEQ ID NO	Наименование	Последовательность (5'-3')
1	HCT116 1	AGCCCTAGAATCCCTTCAC
2	HCT116 2	CTTCTCCACCAATTGGTGTT
3	HCT116 3	GTTTTGTCTCATTATCACGC
4	HCT116 4	CTGTGTTTATGGTGCTTTGT
5	HCT116 5	TGTAAGAAGGCCGAATCACG
6	HCT116 6	TCCTATACGGCTCTACCACT
7	HCT116 7	GTCTAAAGGTTAGAATCCG
8	HCT116 8	GAGACTGCTATCAGTCATGT
9	HCT116 9	TTTTGGTCAAGAGCAGAGGA
10	HCT116 10	TGTGTGCCGTAATATGGGAA
11	HCT116 11	TGACCTTCTGAGTTCCTTAT
12	HCT116 12	GTTTGTCAATACCAGTCAAAG
13	HCT116 13	ACACAGGACCAGAAACCCTG
14	HCT116 14	ACTCTCCAGTTGTTCACTG

15	HCT116 15	GTGCATTTCTCTGCTGAGTC
16	HCT116 16	TATATATCTGCAGGATCTGC
17	HCT116 17	TCTCTTGCTGTAGAGTGGGT
18	HCT116 18	ACACCTGCTTCAGGTGTGTG
19	HCT116 19	CATTTAAAAGGATGCCAGCA
20	HCT116 20	CTGATACTTCTGATACCAGA
21	HCT116 21	G TTCAGCCTGAGTTTGGAGT
22	HCT116 22	AGAGATACAGAAGTCCCTGT
23	HCT116 23	AGATGTGTAAGGTTGCAACA
24	HCT116 24	GAACCACAGAACCTGGCATA
25	HCT116 25	TGACCTTTCACAAAGGCCCA
26	HCT116 26	GCCTCAGGGGAATGGAGATA
27	HCT116 27	TTTGCTACTTTGCTAGGTTT
28	HCT116 28	AGGGAGCTCAGAGTCTTGTG
29	HCT116 29	CTCCTTCCCTTCTGAGTTT
30	HCT116 30	GTGTGAGTGAGAGAGAAAGA

Таблица 2

SEQ ID NO	Наименование	Последовательность (5'-3')
31	U2OS 1	TTATCCAATCAGCTATGGCC
32	U2OS 2	GCTTCACTGGCTTCACTGGA
33	U2OS 3	ATTTGTACAGTCTGCTTACT
34	U2OS 4	GCATCTTCAACAGGTGATTC
35	U2OS 5	TTTCAAGCATTTCAATGCAG
36	U2OS 6	TTCTCTCTGTGCTTCTTTGA
37	U2OS 7	TGGCCCTTGTGGCAGTTTAG
38	U2OS 8	ATGGGATTAATGGGATTGCT
39	U2OS 9	TCATACAGAGAAAGCAGGGC
40	U2OS 10	TCATCTCATGTCTTCTCATG
41	U2OS 11	GACAGAACCCAAGTAATTTTC
42	U2OS 12	TTATGCCATCTGGTCCAGGC
43	U2OS 13	CCAGACATACACTAGGCATC
44	U2OS 14	TCCCGTGAGGCATTCTGTAC

45	U2OS 15	ATTCTTCGTGCTGATGTACC
46	U2OS 16	ACAATCTGTCCAGAGGCCAA
47	U2OS 17	GTGAAGGGCAAGCAAGGACA
48	U2OS 18	TGATATGGCATAGCGATCAT
49	U2OS 19	TACAGCCATGTGGTGTTAC
50	U2OS 20	GGAAACAGCAGCAGTG CACA
51	U2OS 21	CAGGGCTAGACCTTCGTTAT
52	U2OS 22	ATGCAGTGTAGCATGGGGAG
53	U2OS 23	AGTCTTTGGACAAGATGCC
54	U2OS 24	GAAGAAAGAGAAGAGGGCTT
55	U2OS 25	AGCACTTTTATCTCACCTA
56	U2OS 26	ACTGCCTGGGGTTTTCCCTT
57	U2OS 27	GTGTCAACAGGGTCACTCTG
58	U2OS 28	AATTTGCTTTGGAAGGACCT
59	U2OS 29	AGATTCCAGAGTGATGGAAT
60	U2OS 30	AGAGATACAGGAGTCCCTGT



Таблица 3

SEQ ID NO	Наименование	Последовательность (5'-3')
61	RPE1	GAGTAATAAGTCTGCTCTTT
62	RPE2	ACTTTGAGGACCTTGAGGAA
63	RPE3	ACTGTGGGAACTGTGGGAGA
64	RPE4	CAGGCATATTTTCCCATGTA
65	RPE5	ATGTGATGCTGGAGAGAAAT
66	RPE6	GGGGTTAGTTTGTGTTAACT
67	RPE7	ACTTACATCACAGGCATCAC
68	RPE8	ATGCCAGATTCTTCCCACTG
69	RPE9	ACGAACTGTTGGGTGGTGCT
70	RPE10	TTTAATCGAGCACATGCAGG
71	RPE11	TGATGGATCTGATGGATACT
72	RPE12	AAGAAGGGCTGGTTTGTCT
73	RPE13	ACCTGCAGGAACTGAAACAA
74	RPE14	TTGACTCCCATGGTAACCTG

75	RPE15	ATGAGGTTACTCAGAGCCAG
76	RPE16	CACTTGAGTTCAGGAGAGCT
77	RPE17	CTTCACTTCCCTCCTTTCCA
78	RPE18	CACTGCCCTCAAGTCCTTAC
79	RPE19	CAAACCTACCAAATGTCCAC
80	RPE20	TTCTTTGGTTGTGGTGGTTG
81	RPE21	TAGTGTGGGGCATAACACC
82	RPE22	GTGGCATTGGAGTCCATGA
83	RPE23	CTCAGTACTTGGTCTCCTGT
84	RPE24	ACCTCTGAGGGTAACAAA
85	RPE25	CCCTGAATACTGAGCAAAGC
86	RPE26	GGGCAAGTGTGTGAAGTGTG
87	RPE27	ACACAGTAAAGACCCAAGTA
88	RPE28	TGTACATTTCCAGGTTCTTC
89	RPE29	TTGGCCAGCTTGTCTGAGT
90	RPE30	GGCCAAGATTGCATCCAGTC

Во-первых, был проведен эксперимент для определения того, индуцируется ли гибель клеток, когда одновременно происходит множество DSB DNA. Гибель клеток была обнаружена после обработки клеток, полученных путем встраивания домена рецептора эстрогена в рестрикционный фермент AsiSI с 4-ОНТ (тамоксифеном), и результаты представлены на фиг. 1.

Когда рестрикционный фермент AsiSI обрабатывают 4-ОНТ, то он проникает в ядро и распознает определенную последовательность, создавая около 100 DSB DNA (двухцепочечных разрывов). Жизнеспособность клеток после продукции DSB определяют анализом формирования колоний. Через 2 дня после посева 200 клеток, клетки начинают регулярно обрабатывать 4-ОНТ (культуральную среду обрабатывали им один раз каждые 2-3 дня) для получения DSB. Через 2 недели путем окрашивания метиленовым синим определяют, образовались ли колонии. Кроме того, поскольку соответствующие клетки имеют разные размеры колоний, было обнаружено, что обесцвеченные образцы демонстрируют относительную выживаемость клеток, аналогичную таковой для окрашенных образцов.

#### Пример 2. Детекция работы системы CRISPR in vitro

Проводили анализ расщепления in vitro для определения того, работает ли система CRISPR с применением crRNA, полученной в примере 1. Сначала DNA передней и задней частей последовательности вставки амплифицировали до размера 500 п.о. с помощью ПЦР и затем очищали, а потом определяли, была ли DNA расщеплена системой CRISPR с помощью полученной crRNA.

Геномную DNA экстрагировали из клеток RPE1, U2OS и HCT116 с применением мини-набора Qiamp DNA, и специально получали двунаправленные праймеры длиной около 500 п.о. на основе направляющей RNA, взятой в качестве центра. Геномную DNA амплифицировали при заданной температуре отжига с применением DNA-полимеразы iProof High-Fidelity, амплифицированную DNA расщепляли в 1% агарозном геле и проводили экстракцию с применением набора для экстракции геля QiagenQiAquick.

Сырой материал инкубировали при 95°C в течение 5 мин и оставляли охлаждаться до комнатной температуры для получения 10 мкМ комплекса crRNA: tracerRNA. Затем каждый комплекс crRNA:tracerRNA и нуклеазу Cas9 доводили до концентрации 1 мкМ, применяя PBS, и инкубировали в течение 10-ти минут при комнатной температуре для получения комплекса RNP.

10-кратный буфер для реакции с нуклеазой Cas9 (200 мМ HEPES, 1 М NaCl, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭДТА, pH 6,5), 1 мкМ Cas9 RNP, 100 нМ DNA-субстрат и вода, не содержащая нуклеаз, были смешаны, и реакцию расщепления проводили при 37°C в течение 3 ч. Через 3 ч для высвобождения DNA-субстрата из эндонуклеазы Cas9 добавляли 1 мкл 20 мг/мл протеиназы К и инкубировали при 56°C в течение 10 мин. Расщепленную геномную DNA детектировали в 1%-ном агарозном геле.

Таблица 4

Комплекс crRNA:tracerRNA	Количество (мкл)
10 мкМ Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA	10
100 мкМ Alt-R CRISPR-Cas9 tracerRNA	1
Общий объем	100

Таблица 5

2. Комплекс RNP	Количество (мкл)
9 мкМ комплексированной crRNA:tracerRNA	11
Фермент Cas9 (1 мкМ)	1,4
PBS	77,6
Общий объем	90

Таблица 6

3. Расщепление	Количество (мкл)
Реакционный буфер для нуклеазы 10x Cas9	1
1 мкМ Cas9 RNP	2
100 нМ DNA субстрат	2
Вода, свободная от нуклеаз	5
Общий объем	10

Результаты представлены на фиг. 2, и два исходных фрагмента DNA размером 500 п.о. и размером 300 п.о. были обнаружены в агарозном геле. Это доказало, что система CRISPR, применяющая созданную crRNA, работает желаемым образом.

Пример 3. Определение скорости роста клеток после индукции DSB DNA

Клетки колоректального рака HCT116 и клетки остеосаркомы U2OS трансфицировали комплексами рибонуклеотид-белок (RNP) с 30 специфическими последовательностями для индукции DSB DNA, а затем определяли скорость роста клеток с помощью анализа образования колоний.

500 и 1000 клеток были отдельно засеяны и трансфицированы комплексом RNP, специфичным для клеточной линии. 1000 клеток U2OS высевали на чашку диаметром 60 мм и 500 клеток HCT116 высевали на чашку диаметром 60 мм с последующей стабилизацией в течение двух дней для подготовки к трансформации направляющей RNA. Сырой материал хранили при 95°C в течение 5 мин и оставляли охлаждаться до комнатной температуры для образования комплекса из 1 мкМ crRNA и 1 мкМ tracerRNA. Затем проводили реакцию 1,5 мкл 1 мкМ комплекса crRNA: tracerRNA с 1,5 мкл 1 мкМ нуклеазы Cas9 и 22 мкл среды Opti-MEM на 96-луночном планшете при комнатной температуре в течение 5 мин с образованием комплекса RNP. 30 комплексов RNP (25 мкл), 30 × 1,2 мкл реагента для трансфекции RNAiMAX и 30 × 23,8 мкл среды Opti-MEM доводили до 1,5 мл общего объема и оставляли при комнатной температуре на 20 мин для получения трансформантного комплекса. Кроме того, чтобы определить, происходит ли индукция DSB с применением crRNA, специфичной для одной линии клеток, в других линиях клеток, клетки колоректального рака трансфицировали комплексом RNP, специфичным для клеток остеосаркомы, а клетки остеосаркомы также трансфицировали комплексом RNP, специфичным для клеток колоректального рака. В это время одновременно обрабатывали 2 мкМ KU 55933 в качестве ингибитора ATM для ингибирования внутриклеточной системы репарации DSB. Затем, пока контролировали рост клеток, среду меняли каждые 3 дня и дополнительно обрабатывали ингибитором ATM. Через 2 недели рост клеток определяли путем окрашивания метиленовым синим. Количество и площадь окрашенных колоний наблюдали и сравнивали с помощью программы ImageJ, результаты приведены.

Результаты представлены на фиг. 3. Было обнаружено, что в экспериментальной группе, трансфицированной комплексом RNP, специфичным для каждой клеточной линии, DSB индуцировал гибель почти всех клеток, а специфический комплекс RNP не индуцировал DSB в других линиях клеток, поэтому клетки продолжали расти.

Однако в остеосаркоме, трансфицированной комплексом RNP, специфичным для колоректального рака, рост клеток до некоторой степени был подавлен. Причиной этого считается то, что рост клеток по-

давался трансфекцией большим количеством комплексов RNP (30 комплексов RNP). Чтобы компенсировать этот недостаток и определить минимальный комплекс RNP, необходимый для клеточной гибели, клетки RPE1 трансфицировали gRNA из HCT116 и U2OS для определения специфичности crRNA, и минимальное количество gRNA довели до 20 на раковую клетку.

Пример 4. Обнаружение эффекта CINDELA (специфическая для рака, индуцированная вставками-делециями (INsertion-DEletion) гибель клеток)

Новая, специфичная для линии клеток U2OS, crRNA для saCas9 была разработана с помощью WGS (полногеномного секвенирования) и упакована в AAV. Специфические последовательности crRNA, специфичной для линии клеток U2OS, были следующими.

Таблица 7

Номер	Целевая хромосома	Прямая последовательность
91	Chromosome #05	TACCTATGCCTCATGTAGAAA
92	Chromosome #13	ATCGTCAGGTTCTGGGACCGT
93	Chromosome #03	CAGAAGAGAGAGAGTAGTAGA
94	Chromosome #02	GAATGTTTAAGGTATAGTTTA
95	Chromosome #03	TGTTTCAGCAGGGGTTGAAGC
96	Chromosome #04	CTATACCCTAGACTTATTCCCT
97	Chromosome #06	GTTTCTTTCTACAGAATAGAG
98	Chromosome #01	ATAGGTTAACAAAGATATTCA
99	Chromosome #04	CTACAAAATAGGTGACATAAC
100	Chromosome #05	TTAAAATGGCGCAAATAAATT
101	Chromosome #05	TTTTATGAGTCTGCCAGGAAT
102	Chromosome #05	GAAGAAACAATTTTCACTGGG
103	Chromosome #01	CAGGAAGGGAGCTAGTGAGCT
104	Chromosome #05	CCTCTCCTGCTGATGATCCCC
105	Chromosome #01	TGGGCCGCACGTGTGAGTGCC
106	Chromosome #04	AGGAAACAAGCCCATGTTCCC
107	Chromosome #05	CATGGCAGAAAACAGAAAGACA
108	Chromosome #05	AACAGTCTCTGTGATAGGGCA
109	Chromosome #05	GGGAAAATCAGACGGATATTC
110	Chromosome #06	ATTTCTGTTCTTCCCTCACTT

111	Chromosome #06	TAATAACTGTGTAGTTATAAC
112	Chromosome #05	GTTCAGATTAGCTCTTAACTA
113	Chromosome #07	TAAACTTCCTATTTATTGTCT
114	Chromosome #07	ATAACTAATGCCAGGGTGAGT
115	Chromosome #01	CTCCACGCCGGTAGGGTTAGA
116	Chromosome #01	AGTTTGTAGTGTCTTTCCAGA
117	Chromosome #04	TATTTTCCAGATGTTCCAATA
118	Chromosome #05	GA CTATGAGACTACTACTGCA
119	Chromosome #06	CCTTAGCCTCCTTTTCACACA
120	Chromosome #01	AGAGAAGAGAAAATAGGGGAA

Скорость инфицирования клеток AAV измеряли с помощью иммунофлуоресценции и проточной цитометрии. Внутриклеточное окрашивание НА выполняли путем добавления 0,1 М клеток в чашку диаметром 60 мм (день 0), без добавления НА или с добавлением в нее 0,25 мл, 0,5 мл, 1 мл НА для трансфекции клеток AAV (день 2) и сбора и затем окрашивания клеток (день 3). НА (1: 300) инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, мышинные 488 (1:500) инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, РНКазу А инкубировали при 37°C в течение 30 мин и Р1 инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Результаты представлены на фиг. 4. Процент ядерных НА положительных клеток составил около 80% в 1-й день, а процент уменьшался на 2-й и 3-й дни.

$8 \times 10^4$  клеток U2OS высевали на лунку на предметном стекле и выращивали в течение ночи. Клетки дважды промывали ледяным PBS. К нему добавляли 1 мл холодного раствора пермеата (буфер CSK + 0,5% Triton X-100) на 10 мин. Клетки дважды промывали 1 мл холодного PBS. Клетки фиксировали при комнатной температуре в течение 15 мин, применяя 500 мкл 4%-ного параформальдегида в PBS.

Фиксирующее средство удаляли и туда добавляли 1 мл 100%-ного метанола, а затем клетки инкубировали при -20°C в течение 10 мин. Клетки дважды промывали 1 мл PBS.

Клетки блокировали 500 мкл 10%-ного FBS в PBS в течение 30 мин, блокирующий раствор удаляли, а затем к блокирующему раствору добавляли соответствующее первичное антитело на 1 ч. Клетки промывали 3 раза 0,05% Triton X-100 в PBS в течение 5 мин. Вторичное антитело добавляли к клеткам в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин и клетки промывали три раза 0,05%-ным Triton X-100 в PBS в течение 5 мин, а затем промывали PBS и DW. Окружающая камера была удалена со стекла.

На каждый образец по каплям наносили монтажный реагент, и образец закрывали покровным стеклом. В этом состоянии образец высушивали, и предметное стекло было полностью герметизировано. Обнаружение фокуса и визуализацию выполняли с применением программного обеспечения LSM 880 (ZEISS) и ZEN (ZEISS).

Результаты представлены на фиг. 5. Посредством иммунофлуоресценции было обнаружено, что частицы AAV были в достаточной степени трансфицированы и crRNA в табл. 7 способна генерировать фокусы gH2AX, соответствующие DSB DNA.

Система saCAS9 AAV была разработана с применением 30 crRNA, специфичных для линии клеток U2OS, и частицы AAV были трансдуцированы в клетки U2OS.  $8 \times 10^4$  клеток U2OS высевали на 6-луночный планшет и инкубировали в течение ночи для трансдукции клеток с  $9 \times 10^9$  частицами AAV. Как можно видеть на фиг. 6, U2OS-специфическую crRNA-зависимую гибель клеток наблюдали через систему визуализации клеток EVOS через 24 ч. Однако неспецифическая crRNA и специфическая для клеток HCT116 crRNA не были способны вызывать гибель клеток. Результаты, приведенные на фиг. 6, доказали, что селективная гибель клеток, специфичная для клеточной линии, может быть индуцирована системой AAV.

Определяли, происходила ли селективная гибель клеток, специфичная для данной клеточной линии, в нормальных клетках, особенно в клеточной линии RPE1. Как можно видеть на фиг. 7, как в примере 2, система AAV saCAS9, специфичная для линии клеток U2OS, работает и может индуцировать гибель клеток в клетках U2OS, тогда как система AAV, специфичная для линии клеток U2OS, не индуцирует гибель клеток в клетках RPE1.

Была измерена жизнеспособность клеток после специфической для рака гибели клеток, вызванной вставками-делециями (CINDELA). Через 72 ч клетки, трансдуцированные частицами AAV, окрашивали 1%-ным метиленовым синим при комнатной температуре в течение 10 мин. Клетки промывали 3 раза PBS в течение 10 мин и сушили при комнатной температуре. Клетки обесцвечивали 500 мкл 10%-ного раствора уксусной кислоты и измеряли значение OD. Фиг. 8 показывает полученную в результате жизне-

способность раковых клеток.

Жизнеспособность клеток измеряли в зависимости от времени с помощью проточной цитометрии. Клетки U2OS и RPE1 трансдуцировали частицами AAV, специфичными для линии клеток U2OS crRN. Клетки ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл, применяя сыворотку abd, не содержащую азид/PBS без белка. 1 мкл pf FVD добавляли по отношению к 1 мл клеток с немедленным перемешиванием на вортексе. Полученное инкубировали при 4°C в течение 30 мин и свет блокировали. Клетки дважды промывали PBS и проверяли на приборе FACS VERSE (BD Inc.). Как можно видеть на фиг. 9, AAV-зависимая гибель клеток индуцировалась только в линиях клеток, специфичных для crRNA.

Пример 5. Обнаружение эффекта гибели клеток, индуцированного специфичного для глиобластомы INDEL

Эффект гибели клеток, вызванной IN/DEL, был обнаружен в глиобластоме, полученной от пациентов. Эксперимент проводили так же, как в примере 4, за исключением того, что клетки инкубировали в гипоксической камере. Для глиобластомы было доступно всего 16 последовательностей. Обнаружение избирательной гибели клеток с помощью 16 последовательностей, специфичных для глиобластомы, означает образование только 16 DSB DNA.

Таблица 8

Номер	Целевая хромосома	Прямая последовательность
121	Chromosome #05	ACACGGACAAGTTCTCCGTGA
122	Chromosome #13	AACAGTGGGGCAGTTAGGATT
123	Chromosome #03	CACAAGATAGATAGAT AAGAT
124	Chromosome #02	TTTCCAGGTTTGTGATTGAGGT
125	Chromosome #03	CAGATGCCAGAAAGGAGACTG
126	Chromosome #04	GAGGAGAAGCGGCGATAATCT
127	Chromosome #06	GTAGAAGGCTAAATAGTTACC
128	Chromosome #01	TTATAACTAAGATTCTGGCCC
129	Chromosome #04	TCTCTTTGCACCCAGGCATG
130	Chromosome #05	AGATAACAATAATTACTT
131	Chromosome #05	CCCCCTGGCCAGGCAGGGCCG
132	Chromosome #05	AGTAGCACGAACAAAACAAGT
133	Chromosome #01	GAGAAAAATCAGGATAGAGGT
134	Chromosome #05	CTCCACAAGCAGATGATCA AG
135	Chromosome #01	AAGTTTTGTAGAAACTAAAT
136	Chromosome #05	TACTGTGGGATAACTGACGGC

Последовательная трансдукция была выполнена для 16-ти последовательностей, специфичных для глиобластомы. Клетки NSC-10 применяли в качестве нормального контроля. Как можно видеть на фиг. 10, в глиобластоме произошла избирательная гибель раковых клеток.

Пример 6. Эффект гибели клеток в зависимости от наличия киназы ATM

Частицы AAV, содержавшие или не содержавшие ингибитор киназы ATM, трансдуцировали в клетки глиобластомы из примера 5 и эксперимент проводили таким же образом, как в примерах 4 и 5. После 24 ч трансдукции клетки окрашивали 1%-ным метиленовым синим при комнатной температуре в течение 10 мин. Клетки промывали 3 раза PBS в течение 10 мин и сушили при комнатной температуре. Клетки обесцвечивали 500 мкл 10%-ного раствора уксусной кислоты и измеряли OD. Результаты представлены на фиг. 11.

Пример 7. Выявление эффекта специфичной для рака легких IN/DEL-индуцированной гибели клеток

Для обнаружения эффекта специфичной для рака легких IN/DEL-индуцированной гибели клеток (CINDELA), полученную от пациента ткань рака легких применяли для ксенотрансплантата мыши. Полученную от пациента ткань рака легких встраивали в мышь и мышам непрерывно вводили частицы AAV, содержащие 28 crRNA, специфичных для тканей рака легких.

Таблица 9

Номер	Целевая хромосома	Прямая последовательность
137	1	GAGGCTATTGGATTTCAATTTCTAGAGT
138	1	GCACTCACGAGGTACGAGGTGTGGGT
139	2	CTTTCTTAAACATAGAATCTATAGGAT
140	2	GAACAGTGCAAGGATAGGTGTGGGGT
141	3	TGGTGCCCCGGGTTTACACTTAAGAAT
142	3	CTTCATCTATAGGAGCCTCCAGTGAGT
143	4	GGCCTTGAGTGAGGAGAAGGCAGGAGT
144	5	GGTGAAGTACATATTCTCATATGGAGT
145	5	GGGCTCAGTTTTCCACCAGTGGGGGT
146	6	ATACGTTTTTGACggCCAATAGTTGAAT
147	8	ACCTATGATGTGATAGTTTTGTTGGGT
148	8	TAAGACCTCTTAGGAAGTAGAATGAAT
149	9	TTTGAGAGGCAGGGGCACCAGCTGGGT
150	9	TGGAAGAGTGGAAAAAGGTGGAAGAGT
151	10	TCTGCAGAACAGGCGCCAGTCAGAGT
152	10	TGTAGAATTTTTAACTGTTAACAGGAT
153	10	CAGCCAATGGTGTAAAGCTGTGGGT
154	11	TAAAGAGACTCAGGAGAGAAGAAGAT
155	12	CAAGGGAGGTGCCTGGTTGCCCAGAGT
156	12	AGTCTATTTTGATTGTTTTAGGGAGT
157	12	GCATCACTGAAGAATCAGCCTAAGAGT
158	13	GATTTTAATCATAACTGCATGAAGGGT
159	14	GTCACAAGTTTCTGTTTTCTTGGTGGAT
160	15	TCCATCTCTGAAATGTGGATGGAGAAT
161	16	TAAAGGGTGCTTTTCTATTATAGAAT
162	18	TTTGGGAGTGGAGAGATTTGGGGGAGT
163	20	AGGCTCTCAGGGAATGAGAGGAGGGAT

Частицы AAV вводили каждые 2 дня и измеряли размер опухоли. Результаты представлены на фиг. 12. Как можно видеть на фиг. 12, нормальные клетки росли с течением времени, тогда как раковые клетки не росли во время второй инъекции AAV.

Хотя конкретные конфигурации настоящего изобретения были описаны подробно, специалисты в данной области техники поймут, что это описание обеспечивают для изложения предпочтительных вариантов осуществления в иллюстративных целях, и его не следует толковать как ограничение объема настоящего изобретения. Следовательно, существенный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для индукции гибели клеток, имеющих вариации геномной последовательности, включающая  
 нуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу; и  
 расщепляющие агенты, содержащие множество из 10-30 последовательностей нуклеиновых кислот с различными последовательностями, которые специфически распознают последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, включающую вставку и/или делецию (INDEL), специфичную для рака, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности

сти.

2. Композиция по п.1, в которой нуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу, и расщепляющие агенты доставляют в форме вектора или рибонуклеопротеина (RNP).

3. Композиция по п.1, в которой последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая мутантную последовательность, специфичную для клеток рака, распознаваемую расщепляющими агентами, выбирают путем выполнения полногеномного секвенирования (WGS) на клетках, имеющих вариации геномной последовательности, и нормальных клетках.

4. Композиция по п.1, в которой клетки, имеющие вариации геномной последовательности, представляют собой раковые клетки.

5. Композиция по п.1, в которой нуклеаза представляет собой рестрикционный фермент, нуклеазу цинкового пальца (ZNFN), эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), или белок Cas.

6. Композиция по п.5, в которой белок Cas представляет собой Cas3, Cas9, Cpf1, Cas6, C2c12 или C2c2.

7. Композиция по п.5, в которой белок Cas происходит из рода микроорганизмов, включающего ортолог белка Cas, который выбирают из группы, состоящей из *Corynebacter*, *Sutterella*, *Legionella*, *Treponema*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*), *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Flaviivola*, *Flavobacterium*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Neisseria*, *Roseburia*, *Parvibaculum*, *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*), *Nitratifactor*, *Corynebacterium* и *Campylobacter*, и в которой белок Cas выделяют из них или получают с помощью рекомбинации.

8. Композиция по п.1, в которой композиция индуцирует гибель клеток путем индукции двухцепочечного разрыва (DSB) в области последовательности нуклеиновой кислоты, включающей вставку и/или делецию (INDEL), специфичную для клеток рака.

9. Композиция по п.1, дополнительно включающая по меньшей мере один ингибитор ATM (мутантный при атаксии-телангиэктазии), выбранный из группы, состоящей из кофеина, вортманнина, CP-466722, KU-55933, KU-60019 и KU-559403, по меньшей мере один ингибитор ATR (мутантный при атаксии-телангиэктазии и Rad-3), выбранный из группы, состоящей из схизандрина B, NU6027, NVP-BEZ235, VE-821, VE-822 (VX-970), AZ20 и AZD6738, или ингибитор двухцепочечной репарации DNA DNA-РKcs (каталитическая субъединица DNA-зависимой протеинкиназы).

10. Способ получения композиции, включающей нуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу; и расщепляющие агенты, содержащие множество из 10-30 последовательностей нуклеиновых кислот с различными последовательностями, который специфически распознают последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, специфичную для указанных клеток, имеющих вариации геномной последовательности, в которой указанный агент расщепления выбирают следующим образом:

выполнение полногеномного секвенирования (WGS) на клетках, имеющих вариации геномной последовательности, и нормальных клетках;

сравнение полученных данных WGS между клетками, имеющими вариации геномной последовательности, и нормальными клетками для отбора мутантной последовательности, специфичной для клеток, имеющих вариации геномной последовательности; и

получение расщепляющих агентов, которые распознают выбранную мутантную последовательность.

11. Способ получения композиции, включающей нуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу; и расщепляющие агенты, содержащие множество из 10-30 последовательностей нуклеиновых кислот с различными последовательностями, который специфически распознает последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, специфичную для указанных клеток, имеющих вариации геномной последовательности, в которой указанный агент расщепления выбирают следующим образом:

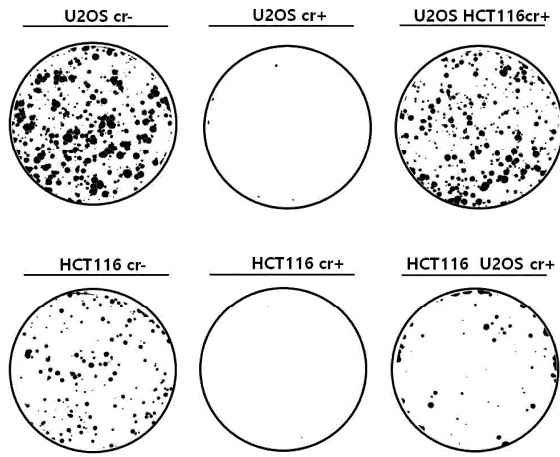
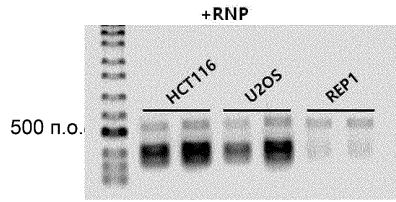
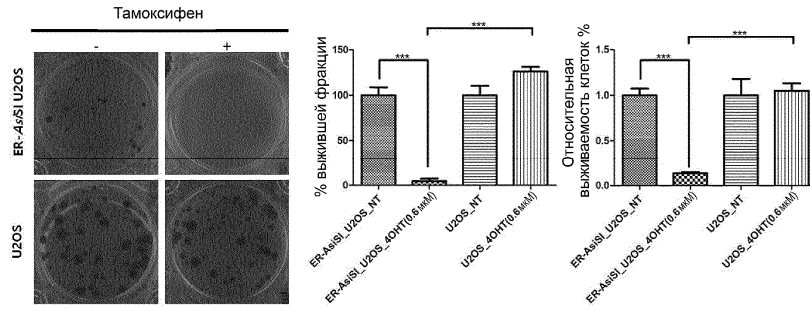
выполнение полногеномного секвенирования (WGS) на клетках, имеющих вариации геномной последовательности, и нормальных клетках;

сравнение полученных данных WGS между клетками, имеющими вариации геномной последовательности, и нормальными клетками для выбора вставки и/или делеции, специфичных для клеток, имеющих вариации геномной последовательности; и

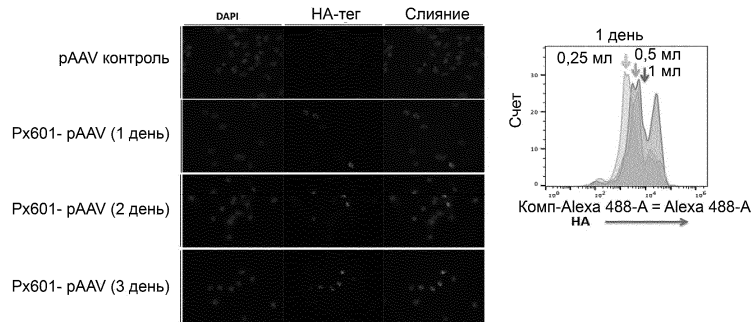
получение расщепляющих агентов, которые распознают выбранную вставку и/или делецию, специфичную для клеток, имеющих вариации геномной последовательности.

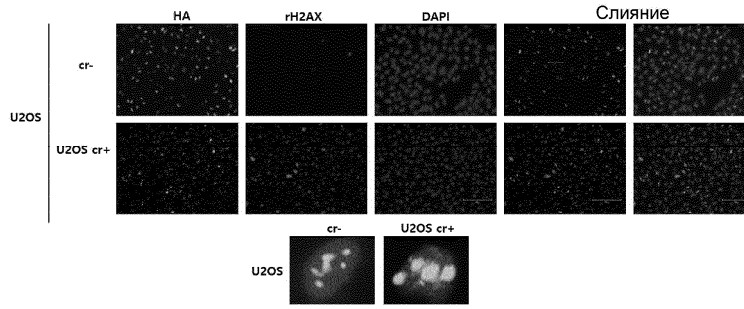
12. Композиция для пациент-специфичного лечения рака, включающая нуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу, и расщепляющие агенты, содержащие множество из 10-30 последовательностей нуклеиновых кислот с различными последовательностями, которые специфически распознают последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантную последовательность, включающую вставку и/или делецию (INDEL), специфичную для рака, специфичную для указанных клеток, имеющих вариации геномной последовательности пациента.





In vitro, заражение вектором CRISPR, подтвержденное с помощью HA IF и HA проточной цитометрией

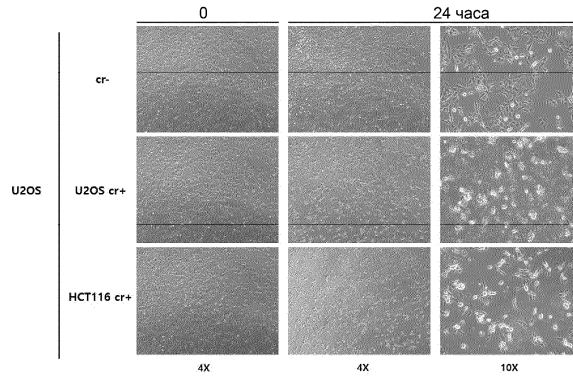




Фиг. 5

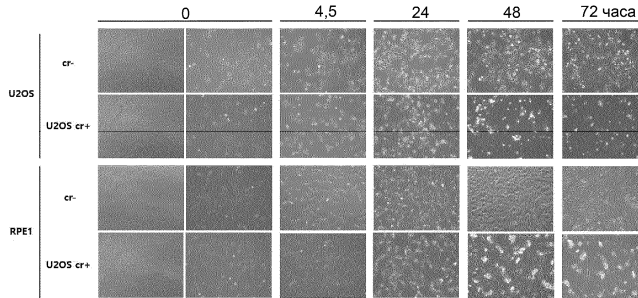
Индукцированный специфическими для рака (C) вставками (IN)-делециями (DEL) апоптоз (A) (CINDELA)

CINDELA в саркоме (30 DSB вводили с помощью системы saCAS9 AAV)



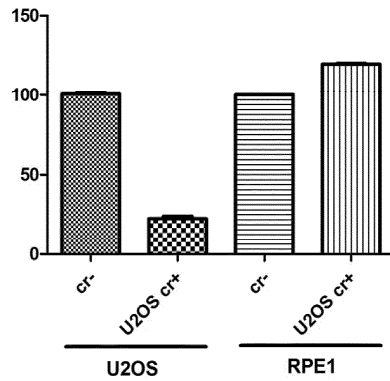
Фиг. 6

CINDELA в саркоме (30 DSB вводили с помощью системы saCAS9 AAV)



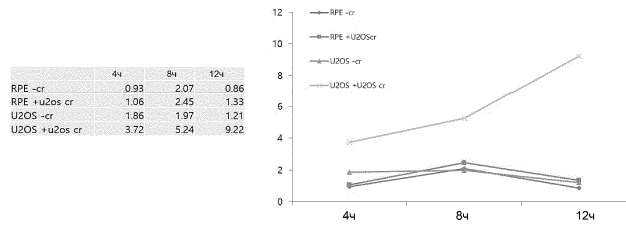
Фиг. 7

Относительный % выживаемости клеток, обусловленный CINDELA



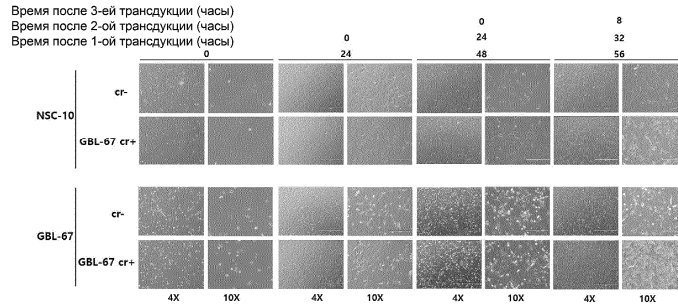
Фиг. 8

Относительный % выживаемости клеток, обусловленный CINDELA



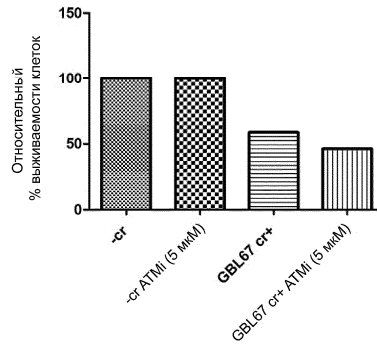
Фиг. 9

CINDELA в глиобластоме (16 DSB вводили с помощью системы saCAS9 AAV)



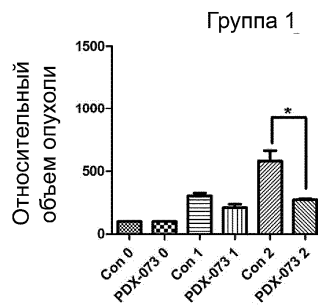
Фиг. 10

Относительный % выживаемости клеток, обусловленный CINDELA



Фиг. 11

Работа системы CINDELA в PDX in vivo  
 мышинной модельной системе ксенотрансплантата



Фиг. 12