

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191333** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.12.15

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВИРУСНОГО ГЕНОМА IN VITRO

(31) **62/092,707; 62/102,362; 62/242,811**

(32) **2014.12.16; 2015.01.12; 2015.10.16**

(33) **US**

(62) **201791343; 2015.12.15**

(71) Заявитель:
СиЗДжей ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Кэди Кайл К., Барбу Э. Магда,
Дипетрилло Кристен Г. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу конструирования нуклеиновых кислот в условиях *in vitro*. Изобретение дополнительно относится к *in vitro* конструированию вирусных геномов и к улучшению вирусных свойств с помощью геномной инженерии *in vitro* вирусных геномов. В частности, изобретение относится к расщеплению вирусного генома в условиях *in vitro* с использованием РНК-направляемой Cas9, сборки рекомбинантного генома путем вставки фрагмента ДНК или РНК в расщепленный вирусный геном и трансформации клетки-хозяина рекомбинантным геномом. Данный способ также относится к конструированию *in vitro* для исправления ошибок в нуклеиновых кислотах.

202191333

A2

A2

202191333

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВИРУСНОГО ГЕНОМА *IN VITRO*

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с USC 119 (e) по предварительной заявке на патент США № 62/092707, поданной 16 декабря 2014 г., предварительной заявке на патент США № 62/102362, поданной 12 января 2015 г., и предварительной патентной заявке США № 62/242811, поданной 16 октября 2015 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[002] Настоящая заявка содержит ссылки на последовательности нуклеиновой кислоты, которые одновременно представлены в виде текстового файла с перечнем последовательностей «SGI1840_3WO_Sequence_Listing_ST25.txt», с размером файла (139 кб) в килобайтах, созданного 15 декабря 2015 г., который включен в качестве ссылки в полном объеме в соответствии со Сводом федеральных нормативных актов США, раздела 37, пункта 1.52(e) (iii) (5).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[003] Настоящее раскрытие в основном относится к быстрому конструированию геномов и, более конкретно, к конструированию вирусных геномов *in vitro*.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Вирусы используют во многих научных целях, особенно при разработке профилактических, терапевтических, и диагностических средств. Для этих целей вирусы часто подвергают генной инженерии. Инженерия *in vitro* требует легко поддающегося обработке организма-хозяина и часто может занять от нескольких недель до нескольких месяцев для создания модифицированных вирусов и вирусных векторов (Levin and Bull, Nat Rev Microbiol., 2004 Feb;2(2): 166-73, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Кроме того, существуют проблемы токсичности, связанные с манипулированием многими вирусными геномами в клетках. Усилия по разработке методов генной инженерии *in vitro* крупных вирусных геномов до сих пор были

ограничены наличием уникальных последовательностей целевых рестрикционных ферментов и низкой эффективностью, полученной для расщепления генома и последующей рекомбинантной сборки. Кроме того, многие усилия в области генной инженерии пресекаются неправильно предсказанными вирусными геномными точками окончания репликации. Например, общедоступные PB1-подобные вирусные геномы неправильно размещают концевые последовательности в середине генома, что является часто встречающейся ошибкой при использовании современных методов секвенирования и сборки генома *in silico* (Ceyssens *et al.*, Environ Microbiol. 2009 Nov;11(11):2874-83).

[005] Остается потребность в быстрой генной инженерии вирусных геномов, особенно для вирусов, инфицирующих генетически неприемлемых хозяев. Настоящее раскрытие использует Cas9-опосредованное расщепление *in vitro* и сборку сайтспецифических модифицированных целых вирусных геномов. Настоящий способ значительно увеличивает точность, простоту и скорость, с которой вирусные геномы могут быть генетически модифицированы. Кроме того, настоящий способ преодолевает общепризнанную сложность манипулирования часто токсичными вирулентными вирусными геномами внутри нативных и гетерологичных клеток-хозяев. Использование раскрытого способа конструирования *in vitro* также позволяет идентифицировать подходящие вирусные геномные концы, что облегчает последующее конструирование при помощи настоящего раскрытия.

[006] Коррекция ошибок *in vitro* представляет собой бесценный метод получения желаемых последовательностей после клонирования или методов сборки. Стандартные методы коррекции ошибок, основанные на ПЦР, которая имеет две неотъемлемые проблемы: 1) ПЦР может вводить дополнительные нежелательные мутации в нуклеиновую кислоту и 2) ПЦР в этом контексте имеет ограничение по размеру приблизительно 5 т.п.н. (тысяча пар нуклеотидов), прежде чем она становится все более подверженной ошибкам (руководство по набору Quick Change site-directed mutagenesis kit, New England Biolabs, США). Поэтому стандартные методы исправления ошибок на основе ПЦР не могут быть надежно выполнены на плаزمиде размером более 5 т.п.н., либо из-за дополнительных создаваемых ПЦР мутаций, либо из-

за невозможности амплификации всей матрицы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] Среди различных аспектов настоящего раскрытия представлены композиции и способы для конструирования последовательностей нуклеиновых кислот *in vitro* с использованием РНК-направляемой нуклеазы. В одном аспекте раскрытие относится к улучшению специфических вирусных свойств при помощи генетической инженерии *in vitro* последовательностей вирусных нуклеиновых кислот и к улучшенным вирусным композициям или частицам. В другом аспекте раскрытие относится к расщеплению *in vitro* последовательностей вирусных нуклеиновых кислот с использованием эндонуклеазы, направляемой РНК, например, Cas9, с последующей сборкой последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента(ов) ДНК или РНК в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту.

[008] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к сконструированному вирусу, содержащему сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту, способную при введении в клетку-хозяина продуцировать не встречающиеся в природе вирусные частицы с двумя или более улучшенными вирусными свойствами по сравнению с вирусными частицами, полученными путем введения несконструированной вирусной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина.

[009] В некоторых аспектах полученные вирусные частицы имеют по меньшей мере три улучшенных вирусных свойства.

[010] В некоторых аспектах каждое улучшенное вирусное свойство выбрано из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунологического надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотической сенсibilизации бактерий, модуляции вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[011] В некоторых аспектах сконструированная вирусная нуклеиновая кислота представляет собой сконструированный вирусный

геном.

[012] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном представляет собой сконструированный геном бактериофага. В некоторых аспектах по меньшей мере одно из улучшенных вирусных свойств представляет собой специфичность к хозяевам.

[013] В некоторых аспектах каждое улучшенное вирусное свойство представляет собой результат по меньшей мере одной модификации в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте.

[014] В некоторых аспектах по меньшей мере одно улучшенное вирусное свойство представляет собой результат по меньшей мере двух модификаций в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте.

[015] В некоторых аспектах по меньшей мере одна модификация в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте представляет собой результат одного этапа конструирования.

[016] В некоторых аспектах по меньшей мере одна модификация в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте представляет собой результат неоднократно повторяемых этапов конструирования.

[017] В некоторых аспектах по меньшей мере одна из модификаций находится в последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 25.

[018] В некоторых аспектах по меньшей мере одна из модификаций находится в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 49.

[019] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 85% идентичности с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит весь или часть гетерологичного гена *gp18*. В некоторых аспектах гетерологичный ген *gp18* имеет по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 26. В некоторых аспектах гетерологичный ген *gp18* кодирует аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 38.

[020] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 85% идентичности с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит весь или часть сконструированного гена *gp34*. В некоторых аспектах сконструированный ген *gp34* кодирует аминокислотную последовательность, содержащую мутацию в положении, соответствующем положению 55 аминокислоты в SEQ ID NO: 5.

[021] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 85% идентичности с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в одной или более последовательностях, имеющих по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 50. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в каждой последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности SEQ ID NO: 1, последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности SEQ ID NO: 2, последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 3 и последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 50. В некоторых аспектах модификации включают замену G на A в положении, соответствующем положению 50 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, замену G на T в положении, соответствующем положению 160 нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 50, замену A на G в положении, соответствующем положению 245 нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 2, замену AT на TC в положениях, соответствующих положениям 247–248 нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 2 и замену A на G в положении, соответствующем положению 757 нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 3.

[022] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 85% идентичности с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно включает модификацию в одной или более последовательностях нуклеиновой

кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности, с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 48. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном включает модификацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей каждую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 34, аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 35, аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 36, и аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 48. В некоторых аспектах модификации включают замену С на У в положении, соответствующем аминокислотному положению 17 в SEQ ID NO: 34, замену D на У в положении, соответствующем аминокислотному положению 36 в SEQ ID NO: 48, замену D на G в положении, соответствующем аминокислотной положению 82 в SEQ ID NO: 35, замену I на S в положении, соответствующем аминокислотному положению 83 в SEQ ID NO: 35, и замену N на D в положении, соответствующем аминокислотному положению 253 в SEQ ID NO: 36.

[023] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 85% идентичности с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в пределах последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 25. В некоторых аспектах модификация представляет собой введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты в последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 25, или замену последовательности, содержащейся в последовательности, имеющей по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 25 с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:

6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, и SEQ ID NO: 20.

[024] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 85% идентичности с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в пределах последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 49. В некоторых аспектах модификация представляет собой введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 49, или замену последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с SEQ ID NO: 49 с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности, с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

[025] В некоторых аспектах сконструированная вирусная нуклеиновая кислота содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, функционально связанную с промотором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, содержащуюся в SEQ ID NO: 21, или ее часть.

[026] В некоторых аспектах сконструированная вирусная нуклеиновая кислота содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, функционально связанную с терминатором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22, или ее часть.

[027] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие

представляет способ создания сконструированного вируса, представляющего интерес, обладающего двумя или более необходимыми вирусными свойствами, включающими: (а) предоставление первого вирусного генома; и (b) создание сконструированного вирусного генома путем объединения по меньшей мере одного фрагмента первого вирусного генома с по меньшей мере одной молекулой восстанавливающей нуклеиновой кислоты для создания второго вирусного генома, содержащего по меньшей мере одну модификацию по сравнению с первым вирусным геномом; при этом второй вирусный геном, будучи введенным в клетку-хозяина, способен продуцировать вирусные частицы с двумя или более улучшенными вирусными свойствами.

[028] В некоторых аспектах способ дополнительно содержит (с) повторение этапов (а) – (b) в одном или более повторениях.

[29] В некоторых аспектах каждое улучшенное вирусное свойство выбрано из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунологического надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотической сенсibilизации бактерий, модуляции вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[030] В некоторых аспектах улучшенное свойство или улучшенные свойства и улучшенное вирусное свойство или улучшенные вирусные свойства используются взаимозаменяемо.

[031] В некоторых аспектах создание сконструированного вирусного генома на стадии (b) включает: (1) расщепление *in vitro* области первого вирусного генома с использованием эндонуклеазы; и (2) сборка по меньшей мере одного фрагмента расщепленного первого вирусного генома с по меньшей мере одной молекулой восстанавливающей нуклеиновой кислоты.

[032] В некоторых аспектах первый вирусный геном выделяют из вирусных частиц.

[033] В некоторых аспектах первый вирусный геном или по меньшей мере одна восстанавливающая молекула нуклеиновой кислоты

синтезируется в условиях *de novo*.

[034] В некоторых аспектах синтез *de novo* включает объединение химически синтезированных молекул нуклеиновой кислоты, ПЦР-амплифицированных последовательностей нуклеиновой кислоты, расщепленных фрагментов выделенных молекул нуклеиновой кислоты или любых их комбинаций.

[035] В некоторых аспектах первый вирусный геном или по меньшей мере одну восстанавливающую молекулу нуклеиновой кислоты амплифицируют перед расщеплением *in vitro*.

[036] В некоторых аспектах первый вирусный геном по меньшей мере 3 т.п.н., по меньшей мере 10 т.п.н., по меньшей мере 18 т.п.н., по меньшей мере, 25 т.п.н. или по меньшей мере 30 т.п.н.

[037] В некоторых аспектах сборку выполняют *in vitro* или *in vivo*.

[038] В некоторых аспектах сборку выполняют *in vitro* со смесью, содержащей: (a) выделенную 5'-3'-эксонуклеазу, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью; (b) выделенную невязкую замещающую ДНК-полимеразу с 3'-эксонуклеазной активностью или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью; (c) выделенную лигазу; и (d) смесь дНТФ в условиях, эффективных для вставки фрагмента в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту с образованием рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей сконструированный вирусный геном.

[039] В некоторых аспектах эндонуклеаза представляет собой РНК-направляемую нуклеазу.

[040] В некоторых аспектах способ дополнительно включает по меньшей мере одну гидовую РНК.

[041] В некоторых аспектах нуклеаза, управляемая РНК, представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9, и в котором по меньшей мере одна гидовая РНК включает 1) химерную гРНК или 2) crРНК и tracrРНК.

[042] В некоторых аспектах эндонуклеазу инактивируют нагреванием или удаляют перед сборкой.

[043] В некоторых аспектах система расщепления *in vitro*

дополнительно содержит спермидин.

[044] В некоторых аспектах способ дополнительно включает трансформирование сконструированного вирусного генома в клетку-хозяина.

[045] В некоторых аспектах способ дополнительно включает использование упаковочного набора *in vitro* для упаковки сконструированного вирусного генома в вирусные частицы.

[046] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие представляет собой сконструированный вирус, полученный любым из способов, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах сконструированный вирус представляет собой любой из сконструированных вирусов, описанных в настоящем документе.

[047] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие представляет набор для конструирования молекул вирусной нуклеиновой кислоты, содержащий: (a) очищенную рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу; (b) выделенную 5'-3'-экзонуклеазу, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; (c) выделенную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-экзонуклеазной активностью или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; и (d) выделенную термостабильную лигазу.

[048] В некоторых аспектах набор дополнительно содержит один или более из: (1) краудинг-агента; (2) смеси ДНТФ; и (3) подходящего буфера.

[049] В некоторых аспектах набор дополнительно содержит специально разработанные тидовые РНК.

[050] В некоторых аспектах набор дополнительно содержит специально разработанные синтезированные молекулы нуклеиновой кислоты, предназначенные для использования в качестве вставленного фрагмента ДНК в реакции сборки.

[051] В некоторых аспектах набор дополнительно содержит компетентные клетки-хозяева для трансформации.

[052] В некоторых аспектах набор дополнительно содержит выделенные вирусные геномные нуклеиновые кислоты.

[053] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие

представляет собой систему сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты *in vitro*, содержащую: выделенную вирусную нуклеиновую кислоту, рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу, по меньшей мере одну гидовую РНК и фрагмент нуклеиновой кислоты, который должен быть вставлен в сайт расщепления выделенной нуклеиновой кислоты.

[054] В некоторых аспектах система такова, что рекомбинантная РНК-направляемая нуклеаза и по меньшей мере одна гидовая РНК образуют комплекс, способный расщеплять выделенную вирусную нуклеиновую кислоту.

[055] В некоторых аспектах система дополнительно содержит спермидин.

[056] В некоторых аспектах система дополнительно содержит: выделенную 5'-3'-экзонуклеазу, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; выделенную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-экзонуклеазной активностью или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; выделенную лигазу; и смесь дНТФ, причем система находится в условиях, которые являются эффективными для вставки фрагмента нуклеиновой кислоты в выделенную вирусную нуклеиновую кислоту в месте расщепления нуклеазой, управляемой РНК, с образованием рекомбинантной вирусной нуклеиновой кислоты.

[057] В некоторых аспектах система, описанная в настоящем документе, такова, что рекомбинантная вирусная нуклеиновая кислота способна продуцировать вирусные частицы, не встречающиеся в природе, по меньшей мере с двумя улучшенными вирусными свойствами по сравнению с вирусными частицами, полученными из несконструированной вирусной нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах улучшенное вирусное свойство или свойства выбраны из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунологического надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотической сенсibilизации бактерий, модуляции вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[058] В некоторых аспектах в системе, описанной в настоящем документе, нуклеаза, управляемая РНК, представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9. В некоторых аспектах РНК-направляемую нуклеазу инактивируют или удаляют перед сборкой.

[059] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие представляет способ конструирования последовательности нуклеиновой кислоты, включающий: (a) обеспечение нуклеиновой кислоты; (b) расщепление *in vitro* области нуклеиновой кислоты с использованием нуклеазы, управляемой РНК; и (c) сборку рекомбинантной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента ДНК в расщепленную нуклеиновую кислоту, причем сборку проводят *in vitro* в одном сосуде со смесью компонентов, включающих: (i) выделенную 5'-3'-эксонуклеазу, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью; (ii) выделенную невымещающую ДНК-полимеразу с 3'-эксонуклеазной активностью или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью; (iii) выделенную лигазу; и (iv) смесь дНТФ в условиях, эффективных для вставки фрагмента в расщепленную нуклеиновую кислоту с образованием рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

[060] В некоторых аспектах нуклеаза, управляемая РНК, представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9. В некоторых примерах нуклеазу, управляемую РНК, инактивируют воздействием тепла или удаляют до сборки.

[061] В некоторых аспектах способ дополнительно включает: (d) трансформацию рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина.

[062] В некоторых аспектах настоящее раскрытие относится к способу получения нуклеиновой кислоты, причем нуклеиновая кислота представляет собой плазмиду, выделенную из клетки-хозяина. В некоторых аспектах плазида составляет по меньшей мере 5 т.п.н. В некоторых аспектах плазида составляет по меньшей мере 6 т.п.н. В некоторых аспектах плазида составляет по меньшей мере 10 т.п.н. В некоторых аспектах плазида составляет по меньшей мере 15 т.п.н. В некоторых аспектах плазида составляет по меньшей мере 20 т.п.н.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[063] На фиг. 1A-1E показана схема процесса *in vitro* для

прямого конструирования вирусных геномов. А) Геномы выделяют из очищенных вирусных частиц с использованием способов, известных специалистам в данной области техники. Серыми линиями показан пример дцДНК вирусного генома. Светло-серыми линиями на концах генома обозначены прямые концевые повторы, обычно встречающиеся во многих вирусных геномах. Б) Вирусные геномы затем расщепляют на одном или нескольких участках местоположения, в частности, используя нуклеазу, управляемую РНК, такую как Cas9, в сочетании с очищенными нацеливающими РНК, такими как химерные гРНК, crРНК и tracrРНК или только crРНК. На иллюстрации изображена РНК-направляемая нуклеаза, нацеленная на определенные вирусные геномные локализации, в соответствии с указанной РНК. В) РНК-направляемую нуклеазу инактивируют с использованием способов, известных в данной области техники, включая, но без ограничений, воздействие тепла и/или удаление с использованием классической экстракции фенол-хлороформом. Г) Вставку ДНК или РНК выполняют с использованием способов, известных в данной области техники, включая, но без ограничений, синтез *in vitro*, амплификацию (ПЦР) или фермент-опосредуемое освобождение от плазмид, вирусов или бактериальной геномной ДНК (гДНК). На диаграмме изображены вновь созданные вставки (темно-серые линии) с областями гомологии, соответствующими вирусным последовательностям, фланкирующим сайт(ы) расщепления РНК-направляемой нуклеазой (серые концевые области). Д) Расщепленные вирусные геномы и очищенную вставку собирают *in vitro* с использованием методов, известных в данной области техники, включая, но без ограничений, метод сборки Gibson Assembly, SLIC (метод безлигазного клонирования, в присутствии белка RecA) и/или сборку Golden Gate. На иллюстрации показан собранный рекомбинантный геном, который теперь содержит новую последовательность вставки (темно-серые линии) в нужной локализации. Е) Рекомбинантные вирусные геномы трансформируют непосредственно в клетки-хозяева с использованием методов, известных в данной области техники, включая, но без ограничений, электропорацию или химическую трансформацию. На фигуре показано восстановление функциональных вирусных частиц после трансформации

инфекционного вирусного генома в восприимчивые клетки-хозяева.

[064] На фиг. 2А-2Е показано конструирование *in vitro* вирусного генома. А) Очистка ~ 43 т.п.н. дцДНК вирусного генома LUZ19 непосредственно от вирусных частиц. Б) Сайтспецифическое расщепление очищенного вирусного генома в двух независимых локализациях для удаления фрагмента гена *gp7* с использованием РНК-зависимой нуклеазы Cas9 и *in vitro* транскрибируемых гРНК. В) ПЦР использовали для амплификации гена *gp7* из вируса ФКФ77. Г) Метод сборки *in vitro* Gibson Assembly использовали для последовательной специфической интеграции ПЦР-амплифицированного фрагмента гена *gp7* ФКФ77 в расщепленный геном LUZ19. Д) Инфекционные геномы, собранные *in vitro*, трансформировали непосредственно в клетки-хозяева для восстановления функциональных вирусных частиц, что подтверждается образованием бактерий. Е) Внутренние и внешние праймеры использовали в ПЦР для проверки того, что вирусы содержат новый фрагмент ДНК в правильном геномном сайте. Все тестируемые вирусные клоны были ПЦР-положительными для новой вставки фрагмента *gp7* ФКФ77 (правые 7 полос).

[065] На фиг. 3А-3Б показано создание вируса с улучшенными вирусными свойствами после *in vitro* вирусного геномного конструирования. А) На диаграмме показаны геномы естественного вируса LUZ19 и сконструированного производного, несущего ген *gp18* вируса LKD16 вместо естественной последовательности *gp18* LUZ19. Черными стрелками обозначены открытые рамки считывания LUZ19, а серой стрелкой указан недавно встроенный ген *gp18* LKD16. Б) Слева на диаграмме Венна показаны общие и отдельные бактерии-хозяева, инфицированные вирусами LUZ19 и LKD16. Были протестированы разнообразные коллекции из 282 клинических изолятов *P. aeruginosa*. Справа на диаграмме Венна показано, что сконструированный вирус LUZ19, содержащий ген *gp18* LKD16, имеет расширенный круг хозяев, включая 3 из 6 штаммов, ранее зараженных только LKD16.

[066] На фиг. 4А-4В показаны схемы, демонстрирующие процесс, используемый для идентификации и выбора генетических элементов и точечных мутаций, необходимых для расширения круга хозяев и разработки способности вирусов с широким кругом хозяев заражать

полный круг хозяев рода вирусов А) Схематическое представление процесса, используемого для идентификации мутаций, ответственных за специфичность к кругу хозяев. Б) На схематическом представлении изображены модификации генома, необходимые для создания вируса LUZ19 с широким кругом хозяев (ШКХ-LUZ19); звездочки (*) определяют локализацию каждой точечной мутации, связанной с кругом хозяев. Метки *gp13* C17Y, *gp18* D36Y, *gp38* D82G и 183 S, и *gp40* N253D описывают генные продукты и аминокислотную точечную мутацию, связанную с расширением круга хозяев LUZ19. PA7245, PA7255, PA7410, PA7427, PA7503 и PA7686 представляют собой клинические изоляты *P. aeruginosa*, восприимчивые только к LKD16 и ШКХ-LUZ19; PA7649 представляют собой клинические изоляты *P. aeruginosa*, чувствительные только к ФКМВ и ШКХ-LUZ19. Клинические изоляты, инфицированные после добавления данной мутации, изображены выше данной мутации. В) Слева на диаграмме Венна показаны общие и отдельные бактерии-хозяева, инфицированные вирусами LUZ19, LKD16 и ФКМВ. Справа на диаграмме Венна показано, что сконструированный вирус ШКХ-LUZ19, содержащий описанные выше точечные мутации, способен заразить все 67 штаммов, восприимчивых к роду вирусов ФКМВ.

[067] На фиг. 5А-5Д показано, что мутация белка Gr34 LUZ19 улучшает литическую активность. А) Белок Gr34 LUZ19 является членом комплекса трубок вируса (см. вставленное изображение). Б) Анализ бляшкообразования в мягком агаре для двух связанных фагов, экспрессирующих или Gr34 LUZ19 дикого типа или Gr34 с разницей в лейцине 55 (L55Δ) (фаг *). Снимки были сделаны Δ в течение двух суток и было показано, что фаг, экспрессирующий мутацию L55 Gr34, имеет зоны повышенного лизиса. В) Анализ биопленки с окрашиванием кристаллическим фиолетовым, экстраполирующий биомассу биопленки в виде измерения включения кристаллического фиолетового. Фаг LUZ19*, экспрессирующий Gr34 L55Δ, был способен лучше разрушать биопленку *P. aeruginosa*, предварительно сформированную в течение 8 часов по сравнению с LUZ19 дикого типа. Гентамицин в десятикратном размере минимальной ингибирующей концентрации (МИК) использовали для

полного удаления биопленки. Г) На иллюстрации показано расположение мутации *gp34* по сравнению с геномом LUZ19 дикого типа. Д) На таблице продемонстрирована разница в величине поглощения и величине выхода фага между LUZ19 и LUZ19, экспрессирующим *Gp34* L55Δ.

[068] На фиг. 6А-6Е представлены схемы, демонстрирующие итеративное конструирование вируса с улучшением до двух независимых свойств. А) Схематическое представление LUZ19_{LKD16gp18} вирусной гДНК, в которой ген *gp18* LUZ19 дикого типа заменен гомологом LKD16. Черным цветом обозначена последовательность генома LUZ19 дикого типа; серым цветом – *gp18* от LKD16. Б) Восприимчивость лабораторных и МЛР клинических штаммов к очищенному исходному (LKD16 и LUZ19) и сконструированному вирусу LUZ19*_{LKD16gp18}, демонстрирующему объединение круга хозяев. В) Схематическое представление вирусной гДНК LUZ19*_{LKD16gp18}, в которой и лейцин, закодированный в позиции 55 *Gp34*, был удален, а *gp18* LUZ19 заменен на *gp18* вируса LKD16. Черным цветом обозначена геномная последовательность LUZ19 дикого типа; серым цветом – *gp18* от LKD16; серая звезда обозначает *gp34*Δ_{1eu55}. Г) Восприимчивость лабораторных и МЛР клинических штаммов к очищенному исходному (LKD16, LUZ19 и LUZ19_{LKD16gp18}, содержащим *gp18* из вируса LKD16) и сконструированному вирусу (LUZ19, несущему делецию лейцина, закодированную в позиции 55 *GP34* и LUZ19*_{LKD16gp18}), демонстрирующему объединение круга хозяев у вирусов LUZ19_{LKD16gp18} и LUZ19*_{LKD16gp18}. Д) Оценка литической активности фага дикого типа и сконструированного фага против бактерий, прикрепленных к монослоям кератиноцитов. Количество бактерий PA01K и PA7245, прикрепленных к клеткам, отмечали как процент от общего количества бактерий, инкубированных с монослоями кератиноцитов. Данные демонстрируют улучшенную литическую активность вирусов LUZ19* и LUZ19*_{LKD16gp18}. Е) Улучшенное раннее разрушение 8-часовой биопленки PA01K и PA7245 при помощи сконструированного фага по сравнению с исходными вирусами. Гентамицин использовали в десятикратном размере минимальной ингибирующей концентрации для полного удаления биопленки. Приведенные данные представляют собой три независимых

эксперимента, выполненных в трех повторениях. Столбцы представляют собой среднее $\pm$ СОС; * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

[069] На фиг. 7А-7Е показаны схемы, демонстрирующие второй пример итеративного конструирования вируса с улучшением до двух независимых свойств. А) Схематическое представление LUZ19, сконструированного для экспрессии различных генетически закодированных полезных нагрузок из улучшенного локуса *gr49*. Ген *gr49* заменяли кассетой, содержащей ген интереса (ГИ), фланкированный основным промотором и терминатором капсида (*gr32*) (P_{gr32} и T_{gr32}). Использовали биопленку, диспергирующую ГИ: ЭПС-деполимеразы ($Pp15gr44$ - хвостовой шип *gr44* из $\phi 15$ *Pseudomonas putida*; $NTUgr34$ - хвостовой шип *gr34* из фага *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044-K1-1 (NTU); $LKA1gr49$ - хвостовой шип *gr49* из фага *P. aeruginosa* LKA1), поверхностно-активные фенол-растворимые морфолины из *Staphylococcus epidermidis* (PSMa) и *Staphylococcus aureus* (PSMa3 и PSMb2) и DspB-сурфактин (дисперсин В-сурфактин) из *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Б) Анализ дисперсии биопленки, демонстрирующий активность сконструированного фага LUZ19 против 24 ч биопленки PAOIK *P. aeruginosa*, обработанной 100 фагами в течение 3 часов. Гентамицин использовали в десятикратном размере минимальной ингибирующей концентрации (МИК). В) Схематическое представление ранее сконструированного фага ШКХ-LUZ19, дополнительно сконструированного для экспрессии ГИ из сконструированного локуса *gr49*. Г) Анализ дисперсии биопленки, демонстрирующий сконструированный ШКХ-LUZ19, дополнительно модифицировали для экспрессии ферментов и сурфактинов с активностью против 24 ч биопленки *P. aeruginosa* PAOIK, обработанной 100 фагами в течение 3 часов. Сконструированная полезная нагрузка: ЭПС-деполимераза $Pp15gr44$ и SePSMa. Гентамицин использовали в десятикратном размере МИК. Д) Восприимчивость лабораторных и клинических штаммов к очищенным исходным (LKD16 и LUZ19) и производным LUZ19, демонстрирующим объединение и сохранение круга хозяев при дальнейшей разработке для экспрессии фрагментов, диспергирующих биопленку. Е) На диаграмме Венна показано сохранение круга хозяев ШКХ-LUZ19 после добавления

биоупленки, диспергирующей полезную нагрузку Pr15gr44 и SePSMa.

[070] На фигурах 8А-8В представлены схемы, демонстрирующие создание вируса, способного помешать клеткам-хозяевам получить резистентность к вирусу в сочетании с субингибирующей концентрацией антибиотика. А) Схематическое изображение LUZ19 дикого типа, сконструированного для экспрессии лизинов из фага или MS2 или PRR1. Б) и В) Анализ зависимости «время - летальное действие», демонстрирующие сенсифицизацию *P. aeruginosa* PAOIK к субингибирующим концентрациям карбенициллина (Cb - 1/5 x МИК) при помощи LUZ19, экспрессирующих лизины из оцРНК бактериофага. Эти данные демонстрируют, что сконструированный бактериофаг, экспрессирующий ненативные лизины в сочетании с субингибирующими концентрациями антибиотиков, может препятствовать быстрому приобретению резистентности бактерий к единственному вирусу.

[071] На фиг. 9А-9Г представлены схемы, демонстрирующие создание 2-ого вируса, способного помешать клеткам-хозяевам получить вирусную резистентность. А) Схематическое изображение LUZ19 дикого типа, сконструированного для экспрессии белка бактериоцина РyoS5 из сконструированного локуса *gr49*. Б) Анализ зависимости «время - летальное действие», демонстрирующие, что рост штамма PA7416 XRSPA был первоначально ингибирован диким типом LUZ19, однако бактерии быстро избегали вируса, что приводило к повторному росту бактерий. Приблизительно 1×10^7 КОЕ добавляли на лунку. Высокую МИ (мощность инфицирования)=10 БОЕ/КОЕ и низкую МИ=0,01 БОЕ/КОЕ указанного вируса или носителя добавляли на 0 ч. В) Тесты на поражение, демонстрирующие, что LUZ19, кодирующий РyoS5, способен ингибировать рост и повторный рост штамма PA7416 XDRPA по сравнению с вирусом дикого типа. Приблизительно 1×10^7 КОЕ добавляли на лунку. В течение 0 ч добавляли высокую МИ=10 БОЕ/КОЕ и низкую МОI =.01 БОЕ/КОЕ указанного вируса или носителя. Г) Сравнение роста PA7416 через 24 часа в присутствии или LUZ19 дикого типа или LUZ19+рyoS5. На графике отображены данные для эксперимента с низким МИ.

[072] На фиг. 10 представлен схематический чертеж системы, включающей редактирование целевого вирусного генома с

фенотипическим скринингом бактериофагов для создания генетически сконструированного бактериофага с улучшением двух или более свойств. Система опирается на неоднократное повторение этапов скрининга и секвенирования мутантных или естественных вирусов с желаемыми фенотипическими признаками и интегрированием данных признаков в одно или более вирусных «шасси» на одном или более этапах конструирования. Данный процесс обеспечивает прямой и рациональный способ быстрой идентификации генетических элементов, лежащих в основе специфического фенотипического признака бактериофага, интегрирования множественных независимых мутаций или аллелей в один геном бактериофага и создания искусственного вируса, сочетающего два или более улучшенных признака.

[073] На фиг. 11А-11Ж показано конструирование *in vitro* генома фага *E. coli* M13. А) Схематическое изображение умеренного фага M13mp18 и M13_{паприка} *E. coli* Б) Электрофорез в геле расщепленной кольцевой геномной ДНК M13 *in vitro* с использованием гРНК 1 и 2 в независимых реакциях с РНК-направляемой эндонуклеазой Cas9. На диаграмме ниже на геле показана кольцевая и линейная природа нерасщепленных и дважды расщепленных геномов M13, соответственно. Эти данные показывают, что обе гРНК точно и полностью расщепляют дцДНК M13 в заданных локализациях. В) Гель-электрофорез расщепленной кольцевой геномной ДНК M13 *in vitro* с использованием как гРНК, так и РНК-направляемой эндонуклеазы Cas9, в той же реакции (двойное расщепление). На диаграмме ниже на геле показана кольцевая и линейная природа нерасщепленных и дважды расщепленных геномов M13, соответственно. Г) Гель-электрофорез, визуализирующий ПЦР полученной вставки, содержащей флуоресцентный репортер паприка. Д) Трансформация расщепленной и собранной *in vitro* сконструированной гДНК M13_{паприка} в клетки *E. coli* для восстановления функциональных вирусных частиц. Вирусные бляшки неотчетливы и скрыты, потому что M13 является умеренным бактериофагом, который не лизирует клетки-хозяева, что приводит к плохому образованию бляшек. В качестве положительного контроля использовали нерасщепленную гДНК M13. ГДНК M13, расщепленная Cas9, но собранная в отсутствие вставки (без вставки) демонстрирует как полноту

расщепления, так и низкий уровень фона. Е) Проверка при помощи ПЦР бляшек сконструированного M13_{паприка}. Прямые и обратные праймеры были разработаны вне областей гомологии вставки. Несконструированная гДНК M13 продуцировала 0,9 т.п.н. продукт и использовалась в качестве отрицательного контроля для реакций ПЦР. Ж) Флуоресцентные (нижние) и яркие (верхние) изображения исходной и сконструированной M13_{паприка} во время образования бляшек.

[074] На фиг. 12А-12Д показано конструирование *in vitro* второго генома фага *E. coli*. А) Схематическое представление фага *E. coli* X Δ сII. Линейный фаговый геном имеет размер 48,5 т.п.н. Б) Гель-электрофорез расщепленной геномной ДНК λ *in vitro* с использованием гРНК 1 и 2 в независимых реакциях с РНК-направляемой эндонуклеазой. На диаграмме ниже на геле показаны линейные нерасщепленные и ожидаемые продукты расщепления. Эти данные показывают, что обе гРНК точно и полностью расщепляют дцДНК λ в заданных локализациях. В) Гель-электрофорез дважды расщепленной геномной ДНК λ *in vitro* с использованием как гРНК, так и РНК-направляемой эндонуклеазы в той же реакции. На диаграмме ниже на геле показаны линейные нерасщепленные и ожидаемые продукты двойного расщепления. Г) На схеме показано использование фагового упаковочного буфера фага λ для упаковки генома дикого типа и рекомбинантного фага *in vitro*. Cas9 с дважды расщепленным и собранным геномом фага были упакованы *in vitro* в соответствии с протоколом изготовителя и покрыты *E. coli* для восстановления недавно сконструированного фага λ Δ сII. Д) ПЦР-проверка гена Δ сII λ . Прямой праймер был расположен снаружи от области конструирования. Делеции положительных клонов имеют ожидаемый размер 300 п.о.

[075] На фиг. 13А-13Г показано конструирование *in vitro* последовательностей из цитомегаловируса человека (ЦМВ). А) Схематическое изображение вирусного генома ЦМВ длиной 235 т.п.н. Сверху геном в форме сигары представляет собой полноразмерный геном, а черный раздел обозначает область манипуляции. Небольшая белая секция означает 235 п.о. вставку, добавляемую с

использованием метода инженерии *in vitro*, описанного в настоящем документе. Б) Гель-электрофорез с дважды расщепленной плазмидой *in vitro*, содержащей 17,8 т.п.н. области генома ЦМВ, с использованием двух гРНК и РНК-направляемой эндонуклеазы Cas9. На диаграмме ниже на геле показаны кольцевые нерасщепленные и линейные дважды расщепленные продукты. Эти данные показывают, что обе гРНК точно и полностью расщепляют последовательность дцДНК ЦМВ в заданной локализации. В) Гель-электрофорез, визуализирующий ПЦР созданной вставки, содержащей новую последовательность вставки RL13. Г) ПЦР-проверка сконструированной последовательности ЦМВ. Прямой праймер был расположен снаружи от области конструирования. Вставки положительных клонов имеют ожидаемый размер 500 п.о.

[076] На фиг. 14А-14Е показана быстрая идентификация концов фага. А) Выделение геномной ДНК из очищенных вирусных частиц. Б) Секвенирование нового поколения гДНК (MiSeq или PacBio) и автоматическое слияние высококачественных считываний ДНК в более длинные сборки для реконструирования исходной последовательности. В светло-сером цвете - ПТП - прямые терминальные повторы. Программное обеспечение автоматической сборки неправильно размещает ПТП терминально повторяющихся геномов во внутренней области вирусной последовательности. Геномные физические концы подтверждены целевым расщеплением Cas9 предсказанной последовательности. В) Прогнозирование *in silico* физических концов генома на основе идентификации областей секвенирования двойного охвата и поиска BLAST, который соответствует близкородственному терминально повторяющемуся геному. Физические концы подтверждаются при помощи расщепления эндонуклеазой Cas9 предсказанных физических концов. Г) После инактивации Cas9 фрагменты ДНК, соответствующие геномным физическим концам, очищают и секвенируют. Д) Точная сборка генома на основе последовательности физических концов. Е) Пример картирования геномных физических концов фагов LBL3 и 14-1 (терминально повторяющихся геномов) с использованием Cas9-направленного расщепления в определенном положении, предсказанного при помощи реанжировки генома *in silico*. Светло-серыми стрелками указано на очищенные и секвенированные фрагменты ДНК.

[077] На фиг. 15А-15В показано схематическое изображение конструирования и стратегия синтеза химерной огРНК. А) На иллюстрации показано расположение мотивов NGG РАМ (темно-серые подчеркнутые последовательности) и целевых сайтов огРНК (светло-серые последовательности), фланкирующих представляющий интерес ген (ГИ). Черные последовательности обозначают оставшиеся вирусные геномные последовательности. Б) Конструирование олигонуклеотидов, используемых в качестве матриц для транскрипции огРНК *in vitro*. Последовательности, составляющие промотор Т7, последовательность направляющей огРНК и консервативную область химерной огРНК, обозначены соответственно подчеркнутым темно-серым, светло-серым и черным текстом. В) Схема *in vitro* транскрибируемой химерной огРНК. Светло-серыми и черными последовательностями указаны нацеливающие и консервативные химерные области, составляющие каждую функциональную огРНК, соответственно. Все Ns обозначают переменные последовательности, используемые для изменения целевой специфичности каждой огРНК.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[078] Настоящее раскрытие обеспечивает композиции и способы для конструирования *in vitro* и и дополнительно относится к улучшению вирусных свойств. Настоящее раскрытие дополнительно обеспечивает способ конструирования нуклеиновых кислот *in vitro*.

[079] До того, как будут описаны настоящие композиции и способы, следует понимать, что это раскрытие не ограничивается конкретными композициями, способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие композиции, способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего раскрытия будет ограничен только в прилагаемой формуле изобретения.

[080] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое

обычно понимается специалистом в данной области техники, к которому относится настоящее раскрытие. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы в практике или тестировании раскрытия, ниже описаны предпочтительные способы и материалы. Определения, изложенные ниже, предназначены для понимания раскрытия, но ни в коем случае не должны считаться заменяющими понимание терминов, которыми обладают специалисты в данной области техники.

[081] Как используется в данном описании и приложенной формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылки на «способ» включают один или более способов и/или этапы, описанные в настоящем документе, которые станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения настоящего раскрытия и т. д.

[082] Используемые в настоящем документе термины «около» или «приблизительно» при обращении к любому численному значению обозначают значение плюс или минус 10% от указанного значения. Например, «около 50 градусов С» (или «приблизительно 50 градусов С») охватывает диапазон температур от 45 градусов до 55 градусов С включительно. Аналогично, «около 100 ммоль/л» (или «приблизительно 100 ммоль/л») охватывает диапазон концентраций от 90 ммоль/л до 110 ммоль/л включительно. В качестве альтернативы «около» или «приблизительно» может означать в пределах 5% от заявленного значения, или в некоторых случаях в пределах 2,5% от заявленного значения, или «около» может означать округление до ближайшей значащей цифры. Все диапазоны, предусмотренные в заявке, включают значения верхнего и нижнего концов диапазона.

[083] Термины «клетки», «культуры клеток», «клеточная линия», «клетки рекомбинантного хозяина», «клетки-реципиенты» и «клетки-хозяева», используемые в настоящем документе, включают первичные клетки-субъекты и любое их потомство независимо от количества пассажей. Следует понимать, что не все потомства точно идентичны исходной клетке (из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций

или различий в окружающей среде); однако такое измененное потомство включено в эти термины, при условии, что потомство сохраняет те же функциональные свойства, что и у изначально трансформированной клетки.

[084] Термин «сборка» или «сборка», используемый в настоящем документе, относится к соединению молекул ДНК или РНК.

[085] Термин «восстанавливающая молекула нуклеиновой кислоты», используемый в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может быть собрана с одним или более фрагментами ДНК или расщеплена, или отщеплена ДНК-плазмидой или молекулой нуклеиновой кислоты ДНК, с тем чтобы создать молекулу непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты или закрытой плазмидной ДНК.

[086] Термины «синтез *de novo*», «сборка *de novo*», «химический синтез» и «синтез ДНК» относятся к способам создания последовательностей нуклеиновых кислот без необходимости использования ранее существовавшей матрицы предшественника.

[087] В тех способах изобретения, которые выполняют «*in vitro*», все белковые компоненты выделяют и/или практически очищают. Реакции сборки *in vitro* не проводят в живой клетке или с необработанным клеточным экстрактом; реакции проводят в бесклеточной среде.

[088] «Функциональная молекула РНК» представляет собой молекулу РНК, которая может взаимодействовать с одним или более белками, или молекулами нуклеиновой кислоты для осуществления или участия в структурной, каталитической или регуляторной функции, которая влияет на экспрессию или активность гена, или продукта гена, отличного от гена, который продуцирует функциональную РНК. Функциональной РНК может быть, например, транспортной РНК (тРНК), рибосомальной РНК (рРНК), антисмысловой РНК (асРНК), микроРНК (микро РНК), короткой шпилечной РНК (кшРНК), малой интерферирующей РНК (миРНК), гидовой РНК (гРНК), *crisp* РНК (срРНК), или трансактивирующей РНК (tracrРНК) системы CRISPR, малые ядрышковые РНК (мякРНК), РНК, взаимодействующие с PIWI, (пиРНК) или рибозимом.

[089] Термин «ген» широко используется для обозначения любого сегмента молекулы нуклеиновой кислоты (обычно ДНК, но необязательно РНК), кодирующего полипептид или экспрессируемую РНК. Таким образом, гены содержат последовательности, кодирующие экспрессируемую РНК (которая может содержать полипептидные кодирующие последовательности или, например, функциональные РНК, такие как рибосомные РНК, тРНК, антисмысловые РНК, микроРНК, короткие шпилечные РНК, гРНК, сrРНК, tracrРНК, рибозимы и т. д.). Гены могут дополнительно содержать регуляторные последовательности, необходимые для их экспрессии или влияющие на их экспрессию, а также последовательности, связанные с белковой или РНК-кодирующей последовательностью в ее естественном состоянии, таком как, например, интронные последовательности, 5'-или 3'-нетранслируемые последовательности и т. д. В некоторых примерах ген может относиться только к кодирующей белок части молекулы ДНК или РНК, которая может содержать или не содержать интроны. Ген предпочтительно составляет более 50 нуклеотидов в длину, более предпочтительно более 100 нуклеотидов и может быть, например, от 50 нуклеотидов до 500 000 нуклеотидов в длину, например, от 100 нуклеотидов до 100 000 нуклеотидов в длину или от около 200 нуклеотидов до около 50 000 нуклеотидов в длину, или от около 200 нуклеотидов до около 20 000 нуклеотидов в длину. Гены могут быть получены из различных источников, включая клонирование из источника, представляющего интерес, или путем синтеза из известной или предсказанной информации о последовательности.

[090] Термин «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» относится к сегменту ДНК или РНК (например, мРНК), а также включает нуклеиновые кислоты, имеющие сконструированные остовы (например, пептидные нуклеиновые кислоты, закрытые нуклеиновые кислоты) или сконструированные или неестественные нуклеотидные основания. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть двухцепочечными или одноцепочечными; одноцепочечная нуклеиновая кислота, которая содержит ген или его часть, может быть кодирующей (смысловой) цепью или не кодирующей (антисмысловой) цепью.

[091] Термины «кодирующая последовательность» или «кодирующая

область», используемые в настоящем документе, относятся к областям последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут быть транскрибированы для получения функциональной РНК или транскрипта РНК, которые могут быть переведены в полипептид, когда они находятся под контролем соответствующих последовательностей контроля экспрессии и в присутствии соответствующих клеточных механизмов или ферментов. Термин «некодирующая последовательность» или «некодирующая область» относится к областям последовательности нуклеиновой кислоты, которые не транскрибируются и не транслируются в аминокислоты (например, интроны, нетранслируемые области и т. д.) или не транскрибируются или не образуют по меньшей мере часть зрелой функциональной последовательности РНК.

[092] Используемый в настоящем документе термин «белок» или «полипептид» предназначен для охвата отдельного «полипептида», а также множественных «полипептидов» и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известные как пептидные связи). Термин «полипептид» относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не относится к определенной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение «полипептид» и термин «полипептид» может использоваться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов.

[093] Молекула нуклеиновой кислоты может быть «получена из» указанного источника, что включает выделение (полностью или частично) сегмента нуклеиновой кислоты из указанного источника. Молекула нуклеиновой кислоты также может быть получена из указанного источника путем, например, прямого клонирования, ПЦР-амплификации или искусственного синтеза из указанного полинуклеотидного источника или на основе последовательности, связанной с указанным полинуклеотидным источником. Гены или молекулы нуклеиновой кислоты, полученные из конкретного источника или вида, также включают гены или молекулы нуклеиновой кислоты,

имеющие модификации последовательности относительно исходных молекул нуклеиновой кислоты. Например, ген или молекула нуклеиновой кислоты, полученные из источника (например, конкретный упоминаемый ген), могут включать одну или более мутаций относительно исходного гена или молекулы нуклеиновой кислоты, которые непреднамеренно или намеренно введены, и если одна или более мутаций, включая замены, делеции или вставки, преднамеренно введены, изменения последовательности могут быть введены случайной или целевой мутацией клеток или нуклеиновых кислот, путем амплификации или другими методами молекулярной биологии или путем химического синтеза или любой их комбинации. Ген или молекула нуклеиновой кислоты, которая получена из упомянутого гена или молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует функциональную РНК или полипептид, может кодировать функциональную РНК или полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с эталонной или исходной функциональной РНК или полипептидом или с его функциональным фрагментом. Например, ген или молекула нуклеиновой кислоты, которая получена из упомянутого гена или молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует функциональную РНК или полипептид, может кодировать функциональную РНК или полипептид, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с эталонной или исходной функциональной РНК или полипептидом или с его функциональным фрагментом.

[094] Используемую в настоящем документе «выделенную» нуклеиновую кислоту или белок удаляют из его естественной среды или окружения, в котором нуклеиновая кислота или белок существуют в природе. Например, выделенный белок или молекулу нуклеиновой кислоты удаляют из клетки или организма, с которым они связаны в своей естественной или природной среде. Выделенная нуклеиновая кислота или белок может быть в некоторых случаях частично или практически очищена, но для выделения не требуется определенный

уровень очистки. Так, например, выделенная молекула нуклеиновой кислоты может быть последовательностью нуклеиновой кислоты, которая была вырезана из хромосомы, генома или эписомы, которая была встроена в природе.

[095] «Очищенная» молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность, или белковая или полипептидная последовательность, по существу свободна от клеточного материала и клеточных компонентов. Например, очищенная молекула нуклеиновой кислоты или белка может быть свободна от химических веществ, если не считать буфер или растворитель. «Существенно свободный» не означает, что другие компоненты за пределами новых молекул нуклеиновой кислоты не поддаются определению.

[096] Термины «естественного происхождения» и «дикого типа» относятся к форме, встречаемой в природе. Например, молекула нуклеиновой кислоты естественного происхождения или дикого типа, нуклеотидная последовательность или белок могут присутствовать и могут быть выделены из природного источника и ненамеренно модифицироваться при помощи человеческих манипуляций.

[097] Термин «экспрессия», используемый в настоящем документе, включает экспрессию гена по меньшей мере на уровне продуцирования РНК, а «продукт экспрессии» включает полученный продукт, например, полипептид или функциональную РНК (например, рибосомальную РНК, тРНК, антисмысловую РНК, микроРНК, кшРНК, рибозим и т. д.) экспрессируемого гена. Термин «повышенная экспрессия» включает изменение в экспрессии генов посредством повышения продукции мРНК и/или увеличения экспрессии полипептида. «Повышенное продуцирование», когда речь идет о количестве белка или количестве активного белка в результате экспрессии генов, скорости текучести белка, состояниях активации белка и т. п., включает увеличение количества полипептидной экспрессии на уровне ферментативной активности полипептида или их комбинации по сравнению с естественным продуцированием или ферментативной активностью полипептида.

[098] «Молекула экзогенной нуклеиновой кислоты» или «экзогенный ген» относится к молекуле нуклеиновой кислоты или

гену, который был введен («трансформирован») в клетку или вирус. Трансформированным организмом можно назвать рекомбинантную клетку или вирус, в который можно ввести дополнительный экзогенный ген(ы). Потомство клетки или вируса, трансформированного молекулой нуклеиновой кислоты, также упоминается как «трансформированное» или «рекомбинантное», если оно унаследовало молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты. Экзогенный ген может быть от другого вида (и, следовательно, «гетерологичного») или от одного и того же вида (и, следовательно, «гомологичного») по отношению к трансформируемому организму. «Эндогенная» молекула нуклеиновой кислоты, ген или белок представляет собой нативную молекулу нуклеиновой кислоты, ген или белок, когда она встречается в организме или естественным образом продуцируется организмом.

[0099] Кроме того, термин «экзогенный», используемый в настоящем документе, в контексте гена или белка, относится к генам или белкам, которые не получают из видов организма-хозяина.

[0100] Термин «трансген», используемый в настоящем документе, относится к экзогенному гену, то есть к гену, введенному в микроорганизм или предшественник путем вмешательства человека.

[0101] Используемый в настоящем документе термин «ортолог» гена или белка относится к его функциональному эквиваленту у другого вида.

[0102] Номера доступа генов и белков, обычно представленные в настоящем документе в скобках после имени гена или вида, являются уникальными идентификаторами для записи последовательности, общедоступной на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (ncbi.nlm.nih.gov), поддерживаемого Национальным институтом здравоохранения Соединенных Штатов. Идентификационный номер последовательности «GenInfo Identifier» (GI) специфичен для нуклеотидной или аминокислотной последовательности. Если последовательность изменяется каким-либо образом, назначается новый номер GI. Инструмент «История изменений последовательности» доступен для отслеживания различных номеров GI, номеров версий и дат обновления для последовательностей, которые отображаются в определенной записи GenBank. Поиск и

получение последовательностей нуклеиновых кислот или генов, или последовательностей белка на основе номеров доступа и номеров GI хорошо известны в данной области техники, например, в клеточной биологии, биохимии, молекулярной биологии и молекулярной генетике.

[0103] Используемые в настоящем документе термины «процент идентичности» или «гомология» в отношении нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей определяются как процент нуклеотидных или аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны с известными полипептидами после выравнивания последовательностей для максимального процента идентичности и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента гомологии. N-концевая или C-концевая вставка, или делеция не должны истолковываться как влияющие на гомологию, а внутренние делеции и/или вставки в последовательность полипептида менее чем около 30, менее чем около 20 или менее чем около 10 аминокислотных остатков не должны быть истолкованы как влияющие на гомологию. Гомологию или идентичность на уровне нуклеотидов или аминокислотных последовательностей можно определить с помощью анализа BLAST (средство поиска основного локального выравнивания) с использованием алгоритма, используемого программами *blastp*, *blastn*, *blastx*, *tblastn* и *tblastx* (Altschul (1997), *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402, и Karlin (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2264-2268), которые предназначены для поиска сходства последовательностей. Подход, используемый программой BLAST, заключается в том, чтобы сначала рассмотреть аналогичные сегменты с гэпами и без них между запрашиваемой последовательностью и последовательностью базы данных, затем оценить статистическую значимость всех идентифицируемых совпадений и, наконец, суммировать только те соответствия, которые удовлетворяют предварительно выбранному порогу значимости. Для обсуждения основных проблем поиска сходства баз данных последовательностей см. Altschul (1994), *Nature Genetics* 6, 119-129. Параметры поиска для гистограмм, описаний, выравниваний, ожиданий (т. е. порог статистической значимости для сопоставления отчетов по последовательностям базы данных), обрезание, матрица и

фильтр (низкая сложность) могут быть в настройках по умолчанию. Матрица выравнивания весов по умолчанию, используемая *blastp*, *blastx*, *tblastn* и *tblastx*, представляет собой матрицу BLOSUM62 (Henikoff (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915-10919), рекомендованную для запрашиваемых последовательностей длиной более 85 (нуклеотидных оснований или аминокислот).

[0104] Для *blastn*, предназначенного для сравнения нуклеотидных последовательностей, матрица подсчета определяется отношениями *M* (т. е. оценкой вознаграждения для пары сопоставимых остатков) к *N* (т.е. оценкой штрафа за несоответствующие остатки), где значения по умолчанию для *M* и *N* могут быть +5 и -4, соответственно. Четыре параметра *blastn* можно настроить следующим образом: *Q*=10 (штраф за создание гэпа); *R*=10 (штраф за продолжение гэпа); *wink*=1 (генерирует попадания слов в каждом просматриваемом в данный момент положении вдоль запроса); и *gapw*=16 (задает ширину окна, в которой создаются выравнивания гэпов). Эквивалентные параметры параметра *Blastp* для сравнения аминокислотных последовательностей могут быть: *Q*=9; *R*=2; *wink*=1; и *gapw*=32. Сравнение *Bestfit* между последовательностями, доступными в пакете GCG версии 10.0, может использовать параметры ДНК *GAP*=50 (штраф за создание гэпа) и *LEN*=3 (штраф за расширение гэпа), а эквивалентные настройки в сравнении с белками могут быть *GAP*=8 и *LEN*=2.

[0105] Таким образом, когда речь идет о последовательностях полипептида или нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению включают идентичности последовательностей по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%), по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85%), например, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%), по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или около 100% идентичности последовательности с полноразмерным полипептидом или последовательностью нуклеиновой кислоты или их

фрагментами, содержащими непрерывную последовательность по меньшей мере в 100, по меньшей мере в 125, по меньшей мере в 150 или более аминокислотных остатков всего белка; варианты таких последовательностей, например, в которых по меньшей мере один аминокислотный остаток был вставлен в N- и/или C-конец и/или в пределах раскрытой последовательности(-ей), которые содержат(ит) вставку и замену. Рассмотренные варианты могут дополнительно или поочередно включать те, которые содержат predetermined мутации, например, путем гомологичной рекомбинации или сайт-направленного или ПЦР-мутагенеза и соответствующих полипептидов или нуклеиновых кислот других видов, включая, но без ограничений, описанные в настоящем документе аллели или другие природные варианты семейства полипептидов или нуклеиновых кислот, которые содержат вставку и замену; и/или производные, в которых полипептид ковалентно модифицирован путем замены, химическим, ферментативным или другим подходящим способом с остатком, отличным от природной аминокислоты, которая содержит вставку и замену (например, детектируемый фрагмент, такой как фермент).

[0106] Термин «нативный», используемый в настоящем документе, для обозначения последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей, поскольку они, естественно происходят в организме хозяина, в организме или вирусе. Термин «ненативный», используемый в настоящем документе, для обозначения последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей, которые не встречаются естественным образом у хозяина, в организме или вирусе. Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая была удалена из клетки или вируса, подвергнута лабораторной манипуляции и введена или повторно введена в клетку-хозяин или вирус, считается «ненативной». Синтетические или частично синтетические гены, вводимые в клетку-хозяин или вирус, являются «ненативными». Ненативные гены дополнительно включают гены, эндогенные к вирусу, функционально связанному с одной или более гетерологичными регуляторными последовательностями, которые были рекомбинированы в геном хозяина.

[0107] «Рекомбинантная» или «сконструированная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая была изменена путем манипулирования, осуществленным человеком. В качестве неограничивающих примеров рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты включает любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая: 1) была частично или полностью синтезирована или модифицирована *in vitro*, например, с использованием химических или ферментативных методик (например, с использованием синтеза химической нуклеиновой кислоты или с использованием ферментов для репликации, полимеризации, расщепления (экзонуклеолитического или эндонуклеолитического) лигирования, обратной транскрипции, транскрипции, модификации оснований (включая, например, метилирование), интеграции или рекомбинации (включая гомологичную и сайт-специфическую рекомбинацию) молекул нуклеиновых кислот); 2) включает соединенные нуклеотидные последовательности, которые не соединены в природе, 3) была сконструирована с использованием методик молекулярного клонирования, так что она не имеет одного или более нуклеотидов по отношению к естественной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты и/или 4) была подвергнута манипулированию с использованием методик молекулярного клонирования, так что она имеет одно или более изменений последовательности или перегруппировок по отношению к естественной последовательности нуклеиновой кислоты. В качестве неограничивающих примеров кДНК представляет собой рекомбинантную молекулу ДНК, как и любая молекула нуклеиновой кислоты, которая была получена полимеразной реакцией (иями) *in vitro* полимеразы или к которой присоединены линкеры или которые были интегрированы в вектор, такой как вектор клонирования или вектор экспрессии.

[0108] Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантный белок» относится к белку, полученному при помощи генной инженерии.

[0109] При применении к организмам или вирусам термин рекомбинантный, сконструированный или генетически сконструированный относится к организмам или вирусам, на которых

воздействовали путем вставки гетерологичной или экзогенной (например, ненативной) рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты в организм или вирус и включает, без ограничений, нокауты генов, целевые мутации и замену гена, замену, делецию или вставку промотора или перенос молекулы нуклеиновой кислоты, например трансгена, синтетического гена, промотора или другой последовательности в организм или вирус. Рекомбинантные или генетически сконструированные организмы или вирусы также могут быть организмами или вирусами, в которые были введены конструкции для «нокдауна» гена. Такие конструкции включают, но без ограничений, одну или более гидовых РНК, РНКи, микроРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловых и рибозимных конструкций. Также включены организмы или вирусы, чьи геномы были изменены действием нуклеаз Cas, мегануклеаз или цинковопальцевых нуклеаз. Молекула экзогенной или рекомбинантной нуклеиновой кислоты может быть интегрирована в рекомбинантный/ генетически сконструированный вирус или геном организма, или в других случаях не интегрирована в рекомбинантный/генетически сконструированный вирус или геном организма. Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантный вирус» или «рекомбинантная клетка-хозяин» включает потомство или производные рекомбинантного вируса согласно настоящему раскрытию. Поскольку определенные изменения могут произойти в последующих поколениях из-за мутации или воздействия, или влияния окружающей среды, такое потомство или производные могут фактически не совпадать с родительской клеткой, но все еще включены в объем термина, как он используется в настоящем документе.

[0110] Используемый в настоящем документе термин «этап конструирования» относится к выполнению любого способа инженерии, раскрытого в настоящем документе или известного в данной области техники. Например, и «этап конструирования» может представлять собой один раунд интересующего инженерного способа, такого как, например, один раунд описанного в настоящем изобретении способа конструирования *in vitro*, один ПЦР-опосредованный мутагенез или одна реакция лигирования, объединяющая две части ДНК вместе.

Аналогичным образом, «неоднократное повторение этапов конструирования» означает выполнение способа конструирования два или более последовательных раз.

[0111] Термин «гетерологичный» при использовании в отношении полинуклеотида, гена, нуклеиновой кислоты, полипептида или фермента относится к полинуклеотиду, гену, нуклеиновой кислоте, полипептиду или ферменту, который не является производным от вида хозяина. Например, «гетерологичный ген» или «гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты», как используется в настоящем документе, относится к последовательности гена или нуклеиновой кислоты от разных видов, чем к видам организма-хозяина или вируса, в который он введен. Когда речь идет о регуляторной последовательности гена или к вспомогательной последовательности нуклеиновой кислоты, используемой для регуляции экспрессии генной последовательности (например, 5'-нетранслируемая область, 3'-нетранслируемая область, последовательность добавления поли-А, последовательность интрона, сайт сплайсинга, сайт связывания рибосом, внутренняя входная последовательность рибосом, область гомологии генома, сайт рекомбинации и т. д.) или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен белка или последовательность локализации белка или белка, «гетерологичная» означает, что регуляторная или вспомогательная последовательность или последовательность, кодирующая белковый домен или последовательность локализации, из другого источника, чем ген, с которым регуляторная или вспомогательная последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белковый домен или последовательность локализации, сопоставляются в геноме, хромосоме или эписоме. Таким образом, промотор, функционально связанный с геном, к которому он не функционально связан в своем естественном состоянии (например, в геноме генетически несконструированного организма или вируса), в настоящем документе упоминается как «гетерологичный промотор», даже хотя промотор может быть получен из одного и того же вида (или, в некоторых случаях, одного и того же организма или вируса) в качестве гена, с которым он связан. Аналогично, когда речь идет

о последовательности локализации белка или белкового домена сконструированного белка, «гетерологичный» означает, что последовательность локализации или белковый домен получают из белка, отличного от белка, в который он включен при помощи методов генной инженерии.

[0112] «Регуляторная последовательность», «регуляторный элемент» или «последовательность регуляторных элементов» относится к нуклеотидной последовательности, расположенной выше (5'), в пределах или ниже (3') кодирующей последовательности. Транскрипция кодирующей последовательности и/или трансляция молекулы РНК в результате транскрипции кодирующей последовательности обычно зависит от наличия или отсутствия регуляторной последовательности. Данные последовательности регуляторных элементов могут содержать промоторы, цис-элементы, энхансеры, терминаторы или интроны. Регуляторные элементы могут быть выделены или идентифицированы из нетранслируемых областей (НТО) из конкретной полинуклеотидной последовательности. Любой из описанных в настоящем документе регуляторных элементов может присутствовать в химерном или гибридном регуляторном экспрессирующем элементе. Любой из описанных в настоящем документе регуляторных элементов может присутствовать в рекомбинантной конструкции согласно настоящему изобретению.

[0113] Термины «промотор», «область промотора» или «последовательность промотора» относятся к последовательности нуклеиновой кислоты, способной связывать РНК-полимеразу с инициацией транскрипции гена в направлении от 5' к 3' («в прямом направлении»). Ген находится «под контролем» или «регулируется» промотором, в том случае, когда связывание РНК-полимеразы с промотором является непосредственной причиной транскрипции указанного гена. Промотор или промоторная область обычно обеспечивает сайт распознавания для РНК-полимеразы и другие факторы, необходимые для правильной инициации транскрипции. Промотор может быть выделен из 5'-нетранслируемой области (5' - НТО) геномной копии гена. Альтернативно, промотор может быть синтетически получен или сконструирован путем изменения известных

элементов ДНК. Также рассмотрены химерные промоторы, которые объединяют последовательности одного промотора с последовательностями другого промотора. Промоторы могут быть определены по их профилю экспрессии гена, основанной, например, на метаболических, экологических или связанных с развитием условиях. Промотор может быть использован как регуляторный элемент для модуляции экспрессии функционально связанной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы, например, кодирующей последовательности. Промоторы могут содержать, помимо последовательностей, распознаваемых РНК-полимеразой и, предпочтительно, другие факторы транскрипции, элементы регуляторной последовательности, такие как цис-элементы или энхансерные домены, которые влияют на транскрипцию функционально связанных генов. «Вирусный промотор» является нативным или ненативным промотором, который инициирует транскрипцию одного или более генов, расположенных в вирусном геноме.

[0114] Используемый в настоящем документе термин «конститутивный» промотор относится к промотору, который активен в большинстве условий окружающей среды и развития. Конститутивный промотор активен независимо от окружающей среды, такой как освещение и композиция культуральной питательной среды. В некоторых примерах конститутивный промотор активен в присутствии и в отсутствие питательного вещества. Например, конститутивный промотор может быть промотором, который является активным (опосредует транскрипцию гена, с которым он функционально связан), в условиях истощения азота, а также в условиях, когда азот не ограничен (условия насыщения азотом). Напротив, «индуцируемый» промотор является промотором, который активен в ответ на конкретные условия окружающей среды, такие как наличие или отсутствие питательного вещества или регулятора, наличие света и т. д.

[0115] Используемый в настоящем документе термин «функционально связанный» обозначает конфигурацию, в которой контрольная последовательность помещается в соответствующее положение относительно кодирующей последовательности

полинуклеотидной последовательности, так что контрольная последовательность направляет или регулирует экспрессию кодирующей последовательности полипептида и/или функциональной РНК). Таким образом, промотор находится в функциональной связи с последовательностью нуклеиновой кислоты, если он может опосредовать транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты. При введении в клетку-хозяина кассета экспрессии может приводить к транскрипции и/или трансляции закодированной РНК или полипептида в соответствующих условиях. Антисмысловые или смысловые конструкторы, которые не транслируются или не могут быть транслированы не исключены данным определением. В случае как экспрессии трансенов, так и подавления эндогенных генов (например, антисмысловыми или РНКи) любой специалист определит, что вставленная полинуклеотидная последовательность не обязательно должна быть идентичной, но может быть только по существу идентичной последовательности гена из которого она была получена. Как поясняется в настоящем документе, эти по существу идентичные варианты конкретно покрыты ссылкой на конкретную последовательность нуклеиновой кислоты.

[0116] Термин «селективный маркер» или «селективный маркерный ген», используемый в настоящем документе, включает любой ген, который придает фенотип клетке, в которой он экспрессируется, для облегчения отбора клеток, которые трансфецированы или трансформированы конструкцией нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Данный термин также может быть использован для обозначения генных продуктов, которые осуществляют указанные фенотипы. Неограничивающие примеры выбираемых маркеров включают: 1) гены, придающие устойчивость к антибиотикам, таким как амикацин (aphA6), ампициллин (ampR), бластицидин (bis, bsr, bsd), блеомицин или флеомицин (ZEOCIN™) (ble), хлорамфеникол (cat), эметин (RBS14p или cry 1-1), эритромицин (ermE), G418 (GENETICIN™) (neo), гентамицин (aac3 или aacC4), гигромицин В (aphIV, hph, hpt), канамицин (nptII), метотрексат (DHFR mtxR), пенициллин и другие β-лактамы (β-лактамазы), стрептомицин или спектиномицин (aadA,

spec/strep) и тетрациклин (tetA, tetM, tetQ); 2) гены, придающие толерантность к гербицидам, таким как аминотриазол, амитрол, анримид, арилоксифеноксипропионаты, атразины, бипиридиуты, бромоксинил, циклогександиеноксима далапон, дикамба, дикфоп, дихлорфенилдиметилмочевина (ДКМ), дифунон, дикетонитрилы, диурон, флуридон, глюфозинат, глифосат, галогенированные гидробензонитрилы, галоксифоп, 4-гидроксипиридины, имидазолиноны, изоксасфлутол, изоксазолы, изоксазолидиноны, мирамид В, п-нитродифениловые эфиры, норфлуразон, оксадиазолы, м-феноксибензамиды, N-фениламины, пиноксадин, ингибиторы протопорфириогеноксидазы, пиридазины, пиразолинаты, сульфонилмочевины, 1,2,4-триазолпиримидин, трикетоны или мочевины; ацетил-КоА-карбоксилаза (АККаза); синтаза ацетогидроксикислоты (ahas); ацетолактатсинтаза (a/s, csrl-1, csrl-2, imr1, imr2), аминогликозид-фосфотрансфераза (apt), антранилатсинтаза, бромоксинилнитрилаза (bxn), цитохром P450-НАДФ-цитохром P450-оксидоредуктаза, далапон-дегалогеназа (dehal), дигидроптероат-синтаза (sul), 5-енолпируватшикимат-3-фосфатсинтаза класса I (EPSPS), класс II EPSPS (aroA), не I/II классов EPSPS, глутатионредуктаза, глифосат-ацетилтрансфераза (gat), глифосат-оксидоредуктаза (gox) гидроксифенилпируватдегидрогеназа, гидроксифенилпируватдиоксигеназа (hppd), изопренилпирофосфат-изомераза, ликопенциклаза, фосфинотрицин-ацетил-трансфераза (pat, bar), фитоэндезатураза (crtl), пренилтрансфераза, протопорфириноксидаза, полипептид psbA фотосистемы II (psbA) и эстераза SMM (SulE) супероксиддисмутаза (sod); 3) гены, которые могут быть использованы в ауксотрофных штаммах или для придания других метаболических эффектов, таких как arg7, his3, hisD, hisG, lysA, manA, metE, nit1, trpB, ura3, xylA, ген дигидрофолатредуктазы, манноза-6-фосфат-изомеразы, ген нитратредуктазы или ген орнитиндекарбоксилазы; фактор негативного отбора, такой как тимидинкиназа; или факторы устойчивости к токсину, такие как ген устойчивости к дезоксиглюкозе.

[0117] «Репортерный ген» представляет собой ген, кодирующий

белок, который обнаруживается или обладает активностью, которая продуцирует детектируемый продукт. Репортерный ген может кодировать визуальный маркер или фермент, который продуцирует детектируемый сигнал, такой как *cat*, *lacZ*, *uidA*, *xylE*, ген щелочной фосфатазы, ген α -амилазы, ген α -галактозидазы, ген β -глюкуронидазы, ген β -лактамазы, гена пероксидазы хрена, ген люциферина/люциферазы, ген R-локуса, гена тирозиназы или ген, кодирующий флуоресцентный белок, включая, но без ограничений, синий, голубой, зеленый, красный, паприка или желтый флуоресцентный белок, фотоотверждаемый, фотографируемый или оптический флуоресцентный белок с подсветкой или любым из его вариантов, включая, без ограничений, оптимизированный по кодону, с быстрым сворачиванием, мономерный, с повышенной стабильностью и варианты с усиленной флуоресценцией.

[0118] Термин «РНК-направляемая нуклеаза» или «РНК-направляемая эндонуклеаза», используемый в настоящем документе, относится к ферменту, расщепляющему нуклеиновую кислоту, который нацелен на целевой сайт расщепления при помощи одной или более гидовых РНК. Неограничивающие примеры РНК-направляемых нуклеаз включают Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 и C2c3.

[0119] Термин «терминатор» или «терминаторная последовательность» или «терминатор транскрипции», используемый в настоящем документе, относится к регуляторной части генетической последовательности, которая вызывает прекращение транскрипции РНК-полимеразой.

[0120] Термины «введение в клетку-хозяин» и «трансформация», используемые в настоящем документе, относятся к введению одной или более экзогенных последовательностей нуклеиновых кислот или «полинуклеотидов» в клетку-хозяин или организм с использованием одного или более физических, химических или биологических методов. Физические и химические методы трансформации (то есть «трансфекция») включают в качестве неограничивающего примера электропорацию, бомбардировку частицами, химически-индуцированную компетентность и доставку липосом. Биологические методы трансформации (то есть «трансдукция») включают передачу ДНК с

использованием вирусов или микроорганизмов (например, *Agrobacterium*).

[0121] Используемый в настоящем документе термин «конструирование» генома относится к определению желаемой последовательности нуклеиновой кислоты конечного генома, представляющего интерес. Конструирование может быть основано на базовых знаниях, литературных источниках, экспериментальных данных или любой их комбинации.

[0122] Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантный» или «сконструированный», когда речь идет о молекуле нуклеиновой кислоты, белке, вирусной частице или их комбинации, означает не имеющую природное происхождение молекулу нуклеиновой кислоты, белок, вирусную частицу или их комбинацию, полученную посредством манипуляции, осуществляемой человеком. В качестве неограничивающих примеров рекомбинантная или сконструированная молекула нуклеиновой кислоты включает любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая: 1) была частично или полностью синтезирована или модифицирована *in vitro*, например, с использованием химических или ферментативных методик (например, с использованием синтеза химической нуклеиновой кислоты или с использованием ферментов для репликации, полимеризации, расщепления (экзонуклеолитического или эндонуклеолитического) лигирования, обратной транскрипции, транскрипции, модификации оснований (включая, например, метилирование), интеграции или рекомбинации (включая гомологичную и сайт-специфическую рекомбинацию) молекул нуклеиновых кислот); 2) включает соединенные нуклеотидные последовательности, которые не соединены в природе, 3) была сконструирована с использованием методик молекулярного клонирования, так что она не имеет одного или более нуклеотидов по отношению к естественной последовательности молекулы нуклеиновой кислоты и/или 4) была подвергнута воздействию с использованием методик молекулярного клонирования, так что она имеет одно или более изменений последовательности или перегруппировок по отношению к естественной последовательности нуклеиновой кислоты. В качестве неограничивающих примеров кДНК представляет собой

рекомбинантную молекулу ДНК, как и любая молекула нуклеиновой кислоты, которая была получена при помощи полимеразной реакции (ий) *in vitro* или к которой присоединены линкеры или которые были интегрированы в вектор, такой как вектор клонирования или вектор экспрессии. Рекомбинантная или сконструированная РНК или белок представляет собой рекомбинантную или сконструированную РНК или белок, которая транскрибируется или транслируется соответственно из рекомбинантной или сконструированной молекулы нуклеиновой кислоты. Рекомбинантная или сконструированная вирусная частица или вирус получают из сконструированной вирусной последовательности или вирусного генома.

[0123] Термин «вирусный геном» относится к полному генетическому комплементу, содержащемуся в одной или более молекулах ДНК или РНК в вирусной частице, включая гены и некодирующие последовательности. Термин «сконструированный вирусный геном» относится к не встречающемуся в природе вирусному геному, который является результатом манипуляции, осуществляемой человеком, и способен продуцировать вирусные частицы, не встречающиеся в природе, после введения в совместимую клетку-хозяина.

[0124] Термин «вирусная нуклеиновая кислота» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, полученную из вирусного генома. «Вирусная нуклеиновая кислота» может содержать целый вирусный геном или часть вирусного генома. Вирусные нуклеиновые кислоты могут кодировать аминокислотные последовательности, содержащие вирусные белки. В некоторых случаях нативные, зрелые белки или полипептидные последовательности, кодируемые данной открытой рамкой считывания, не могут быть определены или охарактеризованы. Аминокислотные последовательности, представленные в настоящем документе, которые кодируются последовательностями вирусной нуклеиновой кислоты, которые могут содержать сайт, подходящий для мутации (такой как изменение, делеция или замена) или вставку гетерологичных последовательностей, могут быть раскрыты в настоящем документе как кодирующие аминокислотные последовательности, которые могут

содержит весь или часть вирусного полипептида или белка.

[0125] Термины «вирусная частица» и «вирион» относятся к независимой форме, в которой существует вирус, когда он не находится внутри инфицированной клетки или в процессе заражения клетки. Данные вирусные частицы (вирионы) состоят или из генома ДНК, или из РНК, окруженного белковой оболочкой, называемой капсидом. Некоторые вирионы также имеют дополнительную липидную оболочку, как внутри, так и снаружи оболочки капсидного белка. Термины «вирусная частица», «вирион» и «вирус» могут использоваться взаимозаменяемо.

[0126] Используемый в настоящем документе термин «вирусное свойство» относится к любому аспекту репликации вируса или жизненного цикла, или к аспекту, который возникает в результате репликации вируса или жизненного цикла. Используемый в настоящем документе термин «вирусное свойство» часто относится к свойствам, которые могут быть изменены или сконструированы посредством вмешательства человека для достижения желаемого результата. Неограничивающие примеры вирусных свойств включают специфичность к кругу хозяев, вирусный литический цикл, адсорбцию, прикрепление, инъекцию, репликацию и сборку, лизис, величину выхода фага, ускользание от иммунологического надзора, иммунную стимуляцию, иммунную деактивацию, дисперсию биопленки, устойчивость к бактериальному фагу, антибиотической сенсibilизации бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина. В некоторых аспектах улучшенное свойство или улучшенные свойства и улучшенное вирусное свойство или улучшенные вирусные свойства используются взаимозаменяемо.

[0127] Термины «бактериофаг» и «фаг» могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к вирусу, который заражает бактерии.

Системы CRISPR

[0128] CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) представляют собой локусы ДНК, содержащие короткие повторы последовательностей оснований. За каждым повтором следуют короткие сегменты «спейсерной ДНК» от предыдущих воздействий на мобильные генетические элементы. CRISPR

обнаруживают в около 40% секвенированных геномов бактерий и 90% секвенированных архей. CRISPR часто ассоциируются с CRISPR-ассоциированными (*cas*) генами, которые кодируют белки, связанные с функцией CRISPR. Система CRISPR-Cas представляет собой прокариотическую иммунную систему, которая обеспечивает устойчивость к чужеродным генетическим элементам, таким как плазмиды и фаги, и обеспечивает форму приобретенного иммунитета. CRISPR-спейсеры кодируют малые стРНК последовательность которых специфически ориентирует эндонуклеазы Cas на целевые последовательности и разрезает эти экзогенные генетические элементы способом, аналогичным РНКи в эукариотических организмах.

[0129] Системы типа II CRISPR-Cas использовали для редактирования генов и регуляции генов у многих видов. Эти системы особенно полезны, потому что они требуют только одну эндонуклеазу Cas (Cas9) и нацеливающую crРНК. В природных системах эндонуклеаза Cas9 требует две независимо транскрибируемые РНК для активности, однако эти две РНК также могут быть ковалентно связаны с образованием одной химерной гРНК. Обеспечивая белком Cas9 и соответствующими гРНК клетку, геном организма можно разрезать в любом необходимом месте. Системы CRISPR-Cas представляют собой РНК-направляемую систему защиты, которая защищает от вирусов, плазмид и других мобильных генетических элементов. Данный защитный путь имеет три этапа. Во-первых, копия встраиваемой нуклеиновой кислоты интегрируется в массив CRISPR. Затем массив CRISPR транскрибируется в большой транскрипт CRISPR и затем процессируется в зрелые crРНК. Затем crРНК вводят в эффекторные комплексы, причем crРНК направляет комплекс к встраиваемой нуклеиновой кислоте, а белки Cas деградируют данную нуклеиновую кислоту. Как указано выше, для нативной системы CRISPR-Cas II типа требуется как транс-активирующая crРНК (*tracrРНК*), так и пре-crРНК для активации Cas9. *TracrРНК* является комплементарной к и комплементарной парами оснований с пре-crРНК, образуя дуплекс РНК. Он расщепляется РНКазой III, РНК-специфической рибонуклеазой, с образованием гибрида crРНК/*tracrРНК*. Этот гибрид выступает в качестве направляющего для эндонуклеазы Cas9, которая расщепляет

встраивающуюся нуклеиновую кислоту, образующую двухцепочечный разрыв в встраивающейся ДНК для защиты клетки-хозяина. Cas9-опосредованное расщепление строго зависит от наличия мотива, смежного с протоспейсером, (PAM) в целевой нуклеиновой кислоте. Возможность программировать Cas9 для расщепления определенных сайтах, определяемых гидовыми РНК, привела к принятию его в качестве универсальной платформы для конструирования генома и генной регуляции. Данный способ конструирования генома описан в публикации заявки на патент США № 2014/0068797, опубликованной 6 марта 2014 года, 2014/0170753, опубликованной 19 июня 2014 года и 2014/0273037 и 2014/0273226, обе из которых опубликованы 18 сентября 2014 года, все из которых включены в качестве ссылки.

[0130] Были описаны другие программируемые системы CRISPR-Cas, которые могут быть использованы для геномной инженерии, включая системы Cpfl, C2c1, C2c2 и C2c3. Система Cpfl представляет собой систему CRISPR V типа и опосредует расщепление ДНК с липкими концами с помощью одной РНК, ориентированной на нацеливание (Zetsche et al., Cell (2015) 163, 1-13) (включен посредством ссылки). C2c1 и C2c3 являются одновременно системами CRISPR V типа, тогда как C2c2 предлагается быть системой CRISPR VI типа (Shmakov et al., Molecular Cell (2015) 60, 1-13) (включен в качестве ссылки).

Сборка ДНК

[0131] Существуют различные методы, известные в данной области техники для сборки ДНК во время генной инженерии. Двухстадийный метод на основе термоциклов использовали для сборки частей гена *M. genitalium*, как описано в Gibson, D. G., et al., «Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome». Science (2008) 319: 1215-1220 (включена в качестве ссылки) и публикации РСТ WO2009/103027 (включены в качестве посредством ссылки). Другой подход описан Li, M. Z., et al., Nature Meth. (2007) 4: 251- 256 (включен посредством ссылки). Одностадийный способ сборки с использованием 5' экзонуклеазы T7 и одноцепочечного ДНК-связывающего белка раскрыт в публикации РСТ WO2006/021944 (включена посредством ссылки). В

настоящее время хорошо известны комбинаторные методики сборки химических соединений для использования при высокопроизводительном скрининге. Кроме того, в течение ряда лет практикуют методики перетасовки генов, в которых кодирующие последовательности случайным образом фрагментируют и повторно отжигают. Например, протоколы для создания библиотек фрагментов химерных генов описаны в Meyer, M. и др. "Combinatorial Recombination of Gene Fragments to Construct a Library of Chimeras" *Current Protocols in Protein Science* (2006) 26.2.1-26.2.17; McKee, A. E., et al., *JBEI* abstract. Методики сборки различных компонентов в полные или минимальные геномы были установлены. Например, публикация патента США 2000/0264688 (включена посредством ссылки), опубликованная 15 ноября 2007 г., описывает способы конструирования синтетического генома путем создания и сборки кассет, содержащих части генома. Поэтапный иерархический способ сборки нуклеиновых кислот описан в публикации патента США № 2007/004041 (включен посредством ссылки), опубликованной 4 января 2007 года.

[0132] Кроме того, метод одного сосуда для сборки ДНК описан в публикации заявки на патент США № 2010/0035768 и 2012/0053087, опубликованы 11 февраля 2010 года и 1 марта 2012 года, соответственно, обе из которых включены посредством ссылки. Данный метод был назван методом сборки Gibson Assembly и позволяет успешно собрать несколько фрагментов ДНК, независимо от длины фрагмента или конечной совместимости. Реакция сборки Gibson Assembly проводится в одном сосуде в изотермических условиях с использованием трех ферментативных активностей: 5'-экзонуклеаза образует длинные липкие концы, полимеразы заполняют промежутки отожденных одноцепочечных областей, а ДНК-лигаза лигирует разрывы отжигом и заполнением промежутков. Данный метод был широко принят и является основной рабочей лошадкой проектов в области синтетической биологии во всем мире. Применяя эту методологию, митохондриальный геном мышцы размером 16,3 т.п.н. был собран из 600 перекрывающихся 60 мономеров. В комбинации со сборкой *in vivo* у дрожжей, метод сборки Gibson Assembly использовали для синтеза 1,1 млн пар оснований генома *Mycoplasma mycoides*. Синтезированный

геном трансплантировали в клетку-реципиент *M. capricolum*, создавая новые самовоспроизводящиеся клетки *M. mycoides*. 5'-экзонуклеазная активность возвращает обратно 5'-концевые последовательности и раскрывает комплементарную последовательность для отжига. Затем полимерная активность заполняет промежутки в отоженных областях. ДНК-лигаза затем заполняют одноцепочечные разрывы и ковалентно связывает фрагменты ДНК вместе. Перекрывающаяся последовательность смежных фрагментов намного длиннее, чем те, которые используются в сборке Golden Gate, и, следовательно, приводит к увеличению процента правильных сборок.

Вирусы

[0133] Вирус представляет собой ультрамикроскопический и метаболически инертный инфекционный агент, который реплицируется только внутри клеток живых хозяев. Вирусы могут заражать все типы жизненных форм, включая животных, растения, грибы, водоросли, бактерии и археи. Хотя они не находятся внутри инфицированной клетки или в процессе заражения клетки, вирусы существуют в виде независимых частиц. Данные вирусные частицы (вирионы) состоят или из генома ДНК, или из РНК, окруженного белковой оболочкой, называемой капсидом. Некоторые вирионы также имеют дополнительную липидную оболочку, как внутри, так и снаружи оболочки капсидного белка.

[0134] Существует два цикла вирусной репликации, однако терминология варьирует между прокариотическими и эукариотическими вирусными полями. Скрытые или лизогенные вирусы объединяют вирусный генетический материал в геном клетки-хозяина или образуют эписомальный репликон. Когда клетка-хозяин реплицируется, вирусный генетический материал также копируется и продолжает разделяться с геномом хозяина до начала вирусного продуцирования. Начало вирусного продуцирования и гибель клеток являются маркерами литического или вирулентного цикла. Во время литического цикла вирусный геном реплицируется отдельно от гена хозяина и захватывает механизмы репликации и трансляции клеток, чтобы создавать больше вирусов. После накопления достаточного количества вирусов специализированные вирусные белки растворяют клеточную

стенку и/или мембрану хозяина. Клетка-хозяина лопається из-за высокого внутреннего осмотического давления, этот процесс называется лизисом. Это высвобождает потомство вирусов в среду, где они могут заражать другие клетки и повторять процесс. Вирулентные вирусы – это те, которые не входят в латентное или лизогенное состояние, но вместо этого реплицируются только путем захвата механизма клеток-хозяев (в отличие от умеренных вирусов, которые входят в латентное состояние).

Исследования вирусной мутации

[0135] Вирусные мутационные исследования, используемые в настоящем документе, относятся к исследованиям быстрой эволюции, адаптации и/или случайному или направленному мутагенезу, и данные термины могут использоваться взаимозаменяемо. Исследования в области эволюции и/или адаптации включают выбор вирусов по определенным признакам или при определенных условиях. Данные методы особенно полезны для вирусов из-за естественной высокой скорости мутаций, присущей вирусной репликации, что приводит к большому количеству вирусного разнообразия. Например, штаммы можно выращивать в условиях высокой температуры, чтобы наблюдать молекулярные изменения, которые способствуют выживанию и размножению в этих условиях. В качестве неограничивающих примеров можно выделить эволюцию или адаптацию эксперимента вируса или бактериофага для выбора вариантов с изменением круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунологического надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагу, антибиотической сенсibilизации бактерий, модуляцию факторов вирулентности, или направленного расщепления или редактирования гена хозяина. Неограничивающие примеры экспериментов по эволюции вируса или адаптации включают эксперименты по коинфекции, коэволюции или контрансформации. Коинфекция относится к более чем одному вирусу, заражающему один и тот же хозяин одновременно, что часто приводит к обмену генами между двумя или более вирусами. Коэволюция относится к исследованию, в котором рекомбинация между

двумя или более вирусами или бактериофагами происходит в пермиссивном или непермиссивном хозяине, что приводит к сборке нового вируса или бактериофага с различными вирусными свойствами, такими как, например, более широким кругом хозяев. Котрансформация относится к тому, когда два «оголенных» генома трансформируются вместе в пермиссивном или непермиссивном штамме. Любое из этих исследований эволюции или адаптации может быть выполнено в пермиссивном (восприимчивом) или непермиссивном (резистентном) хозяине. Данные типы экспериментов часто включают передачу вируса несколько раз выбранному хозяину в отсутствии или присутствии одного, или более других выбранных вирусов. Вирусы будут получать мутации, которые приводят к множественным вариантам. На протяжении всего пассирования некоторые варианты будут обогащаться в зависимости от условий пассирования и отбора.

[0136] Мутагенез может быть выполнен любым способом, например, инсерционным мутагенезом, химическим мутагенезом, гамма-облучением или ультрафиолетовым облучением, или ПЦР-опосредуемым мутагенезом. Способы получения мутантов или варианты геномных последовательностей хорошо известны. Например, гамма-облучение, УФ-облучение и обработка любым из большого числа возможных химических мутагенов (например, 5-бромдезоксимуридин, этилметансульфонат (EMS), метилметансульфонат (MMS), диэтилсульфат (DES), нитрозотетрагидропиридин (NTG), соединения ICR и т. д.) или лечение соединениями, такими как эндеиновые антибиотики, которые вызывают разломы хромосом (например, блеомицин, адриамицин, неокарзиностатин) представляют собой методы, которые применяют для мутагенеза водорослей, грибов и хитридиомикетов (см., например, патент США 8232090, заявка на патент США 20120088831, заявка на патент США 20100285557, заявка на патент США 20120258498). В данной области техники известно большое количество химических мутагенов, включая, но без ограничений, интеркалирующие агенты, алкилирующие агенты, дезаминирующие агенты, аналоги оснований. Интеркалирующие агенты включают в качестве неограничивающих примеров производные акридина или производные фенантридина, такие как бромид этидия (также известный как 2,7-диамино-10-этил-6-фенилфенантридбромид

или 3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридинийбромид). Неограничивающие примеры алкилирующих агентов включают производные нитрозогуанидина (например, N-метил-N'-нитро-нитрозогуанидин), этилметансульфонат (EMS), этилэтансульфонат, диэтилсульфат (DES), метилметансульфонат (MMS), азотистую кислоту или HNO_2 , и азотистый иприт или соединения ICR. Неограничивающие примеры аналогов оснований, которые могут быть использованы в качестве мутагенов, включают соединение 5-бром-урацил (также известный как дезоксинуклеозид 5-бромдезоксиуридин), 5-бромдезоксиуридин и 2-аминопурин. Методы мутагенеза на основе ПЦР хорошо известны в данной области техники и часто включают условия реакции и/или ДНК-полимеразу, которая увеличивает частоту ошибок в течение ПЦР-амплификации.

[0137] Мутагенез может дополнительно или альтернативно включать введение экзогенных молекул нуклеиновой кислоты непосредственно в вирусный геном или в клетку-хозяина для последующей рекомбинации в представляющий интерес вирусный геном. Например, экзогенная молекула нуклеиновой кислоты, введенная в клетку-хозяин, может интегрироваться в вирусный генетический локус путем случайной или целевой интеграции, влияя на экспрессию генов, в которые вставляются чужеродные ДНК-вставки или гены, которые являются проксимальными по отношению к чужеродной ДНК, вставленной в геном (например, патент США 7019122; патент США 8216844). Как правило, введенная молекула нуклеиновой кислоты содержит селективируемый маркерный ген для отбора трансформантов, которые интегрировали конструкт молекулы экзогенной нуклеиновой кислоты. Молекула экзогенной нуклеиновой кислоты в некоторых вариантах реализации изобретения может включать транспонируемый элемент или его компонент, такой как, например, инвертированные повторы, которые могут быть распознаны транспозазой и/или геном, кодирующим транспозазу, или молекула экзогенной нуклеиновой кислоты может быть основана по меньшей мере частично на вирусе, таком как интегрирующий вирус.

[0138] Для случайного инсерционного мутагенеза конструкция предпочтительно содержит селективируемый маркер, который может быть

использован для выбора трансформантов, имеющих интегрированный конструкт, и необязательно также может служить маркером сегрегации и молекулярной меткой для выделения и идентификации гена, прерванного интегрированным селектируемым маркерным геном. Селективные маркеры не ограничиваются генами устойчивости к антибиотикам, но также включают любой ген, который может обеспечить преимущество роста вирусу (оба гена установленной и гипотетической функции). Альтернативно, специфический генетический локус может быть нацелен. Конструкция для разрушения гена может включать, например, селектируемый маркерный ген, фланкированный последовательностями из интересующего генетического локуса, например, по меньшей мере часть гена, который кодирует регулятор, и, необязательно, дополнительные геномные последовательности, окружающие ген. Такие фланкирующие последовательности могут содержать, например, по меньшей мере 50 нуклеотидов, по меньшей мере 100 нуклеотидов, по меньшей мере 500 нуклеотидов или по меньшей мере 1 тысяча пар нуклеотидов геномной последовательности.

[0139] Сбор вирусных вариантов может быть создан любым из вышеперечисленных способов, другими способами, хорошо известными в данной области техники или любой их комбинацией. Затем набор вариантов можно скринировать для обеспечения необходимого фенотипа. Выделенные вирусы с желаемым фенотипом(ами) могут быть подвергнуты дополнительным этапам исследований мутаций. Выделенные вирусы, демонстрирующие желаемые свойства или фенотипы, могут быть дополнительно или альтернативно секвенированы для идентификации генетической мутации, ответственной за желаемое свойство или фенотип. Эти идентифицированные генетические поражения могут быть подтверждены повторением мутации в чистом эталонном фоне и тестированием желаемого свойства или фенотипа.

Вирусные полезные нагрузки

Литические ферменты

[0140] «Литический фермент» включает любой литический фермент бактериальной клеточной стенки, который убивает одну или более бактерий в подходящих условиях и в течение соответствующего

периода времени. Примеры литических ферментов включают, без ограничений, различные амидазы клеточной стенки. Литическим ферментом может быть литический фермент бактериофага, который относится к литическому ферменту, экстрагированному или выделенному из бактериофага или синтезированного литического фермента с аналогичной структурой белка, которая поддерживает литическую функциональность фермента.

[0141] Литический фермент способен специфически расщеплять связи, которые присутствуют в пептидогликане бактериальных клеток, чтобы разрушить клеточную стенку бактерий. В настоящее время также постулируется, что пептидогликан бактериальной клеточной стенки очень консервативен среди большинства бактерий, и расщепление только нескольких связей может нарушить клеточную стенку бактерий. Примерами литических ферментов, которые расщепляют эти связи, представляют собой мурамидазы, глюкозаминидазы, эндопептидазы или N-ацетил-мурамоил-L-аланиновые амидазы. Fischetti et al. (1974) сообщили, что фермент лизин C1 стрептококкового бактериофага представляет собой амидазу. Garcia et al. (1987, 1990) сообщили, что лизин Cpl из *S. pneumoniae* из фага Cp-1 представляет собой лизоцим. Caldenty and Bamford (1992) сообщили, что литический фермент из фага φ6 *Pseudomonas* представляет собой эндопептидазу, разделяющей пептидный мост, образованный меламинампилиновой кислотой и D-аланином. T1 и T6 литические ферменты фага *E. coli* представляют собой амидазы, как и литический фермент из фага *Listeria* (ply) (Loessner et al., 1996). Существуют также другие литические ферменты, известные в данной области техники, которые способны расщеплять клеточную стенку бактерий.

[0142] Литический фермент, генетически кодируемый бактериофагом, содержит полипептид, способный убивать бактерию-хозяина, например, путем по меньшей мере разрушения клеточной стенки или ингибирования активности клеточной стенки против бактерий-хозяев. Полипептид может иметь последовательность, которая охватывает нативные литические ферменты и их варианты. Полипептид может быть выделен из множества источников, например, из бактериофага («фага») или получен путем рекомбинантных или

синтетических методов. Полипептид может, например, содержать холинсвязывающую часть на карбоксильной концевой стороне и может быть охарактеризован ферментативной активностью, способной расщеплять пептидогликан клеточной стенки (такой как активность амидазы действовать на амидные связи в пептидогликане) на аминоконцевой стороне. Были описаны литические ферменты, которые включают множественные активности ферментов, например, два ферментативных домена, такие как лизин PlyGBS. Кроме того, описаны другие литические ферменты, содержащие только каталитический домен и домен, не связывающий клеточную стенку.

Полипептиды для подавления кворума

[0143] Автоиндукторы представляют собой небольшие химические сигнальные молекулы, продуцируемые и используемые бактериями, участвующими в определении кворума. Чувство кворума позволяет бактериям ощущать друг друга посредством наличия аутоиндукторов и регулировать самые разнообразные поведения на уровне группы. Такое поведение включает симбиоз, вирулентность, подвижность, продуцирование антибиотиков и образование биопленки. Автоиндукторы входят в различные химические формы в зависимости от вида, но во многих случаях эффект, который у них есть, во многом аналогичен, что позволяет генетически сконструированным бактериофагам воздействовать на самые разнообразные бактерии, использующие подобные автоиндукторы. В целом, грамотрицательные бактерии используют AHL в качестве аутоиндукторов, а грамположительные бактерии используют процессированные олигопептиды для коммуникации, в то время как автоиндуктор 2 (AI-2) является универсальным для грамотрицательных и грамположительных бактерий.

[0144] AHL, продуцируемые различными видами грамотрицательных бактерий, различаются по длине и составу ацильной боковой цепи, которая часто содержит от 4 до 20 атомов углерода. AHL способны диффундировать в и из клеток как с помощью пассивного транспорта, так и с помощью активных механизмов транспорта. Рецепторы для определения AHL включают ряд регуляторов транскрипции, таких как LuxR, которые функционируют как ДНК-связывающие факторы транскрипции, которые могут активировать разнообразную экспрессию

генов, регулирующих поведение популяции бактерий.

[0145] Автоиндукторы могут быть ингибированы полипептидами, подавляющими кворум. Полипептиды для подавления кворума могут модифицировать или деградировать автоиндукторы, чтобы сделать их менее активными или неактивными. Определенные полипептиды для подавления кворума представляют собой ферменты, которые инактивируют автоиндуктор (например, путем модификации или деградации), такой как описанный в настоящем документе белок лактоназы AiiA, который расщепляет лактонные кольца из ацильных фрагментов AHL с широкой субстратной специфичностью для инактивации AHL из различных бактерий (Wang et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(14):136.45-51).

[0146] Предлагаемый в настоящем документе способ конструирования *in vitro* может быть использован для получения синтетического бактериофага, сконструированного для кодирования, например, полипептида, подавляющего кворум, полученного из *Pseudomonas aeruginosa*. Полипептиды, подавляющие кворум, могут быть экспрессированы в виде свободных белков, которые высвобождаются в область, окружающую фаг и/или бактерии, например, при фаговой инфекции и лизении бактерий-хозяев. Не исключено также, что полипептиды, подавляющие кворум, также могут быть экспрессированы и активно секретированы из клетки бактериального хозяина с использованием способов, известных в данной области техники. Аналогичным образом, полипептиды, подавляющие кворум, могут быть трансляционно слиты с белком бактериофага, например, капсидным, хвостовым или шейным белком.

Хвостовые волокна

[0147] Раскрытие изобретения предусматривает в некоторых вариантах реализации изменение круга хозяев бактериофага при помощи сконструированного рекомбинантного бактериофага. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение круга хозяев вируса включает конструирование вируса с гетерологичными, нативными, ненативными хвостовыми волокнами и любой их комбинацией. Специфичность клеток-хозяев бактериофага может зависеть от хвостовых волокон(а) вирусной частицы. Путем изменения

(например, замены и/или мутации) хвостовых волокон или частей хвостовых волокон бактериофага-хозяина, круг хозяев может быть изменен (например, расширен).

[0148] Хвостовые волоконные белки обычно содержат детерминанты антигенности и детерминанты круга хозяев. Гетерологичное хвостовое волокно может быть закодировано набором геномных фрагментов, выделенных или синтезированных на основе генома одного типа бактериофага. Набор фрагментов гена хвостового волокна может содержать подмножества геномных фрагментов, выделенных или полученных на основе геномов нескольких бактериофагов. Например, консервативные области хвостового волокна могут быть закодированы геномными фрагментами, выделенными из генома шасси бактериофага, в то время как области детерминант круга хозяев могут быть закодированы геномными фрагментами, выделенными из генома другого типа бактериофага.

Антимикробные пептиды

[0149] Раскрытие изобретения рассматривает в качестве неограничивающего примера бактериофаг, сконструированный для экспрессии антимикробного пептида, который необязательно секретируется клеткой-хозяином. Например, сконструированные бактериофаги могут экспрессировать антимикробный агент, такой как антимикробный пептид (AMP) или антимикробный полипептид, включая, но без ограничений, естественные пептиды для предотвращения развития и/или распространения устойчивости бактерий-хозяев к бактериофагу и для обеспечения более быстрого и эффективного уничтожения бактерий при бактериальных инфекциях, таких как бактериальные инфекции, включающие более одного вида бактерий.

[0150] Бактериофаги обеспечивают аттрактивный противомикробный агент для устранения бактериальных инфекций из-за их усиления и механизма хозяина-хищника, например, путем распространения в бактериях-хозяевах, а затем уничтожения бактерий в форме лизиса, что приводит к высвобождению размноженных бактериофагов, которые впоследствии заражают и убивают окружающие бактерии тем же механизмом. Практическое использование бактериофага в устранении бактериальных инфекций обусловлено

значительными ограничениями, такими как (i) очень узкий круг бактерий-хозяев как внутри, так и между видами, и (ii) очень быстрое развитие устойчивости к бактериофагу популяцией бактерии-хозяина. Таким образом, как это часто бывает во многих областях науки, теоретический результат трудно достичь в реальных жизненных ситуациях. Поэтому, в то время как бактериофаги кажутся полезными в качестве антимикробных агентов в теории, на практике они сдерживают антимикробные свойства, и их использование для устранения бактериальных инфекций очень трудно достичь из-за быстрого развития устойчивости хозяина к бактериофагу. Следовательно, бактериофаги были неэффективны при длительной элиминации бактерий-хозяев.

[0151] Соответственно, настоящее изобретение относится к сконструированному бактериофагу, кодирующему антимикробный агент, причем бактериофаг модифицирован или сконструирован для экспрессии антимикробного пептида (AMP), который необязательно секретируется клеткой-хозяином. по меньшей мере одну или любую комбинацию различных антимикробных агентов сконструированного бактериофага могут использовать отдельно или в любой комбинации для устранения или уничтожения бактериальной инфекции. В некоторых вариантах реализации изобретения сконструированный бактериофаг, кодирующий антимикробный агент, может быть использован с дополнительными агентами, такими как другой антимикробный агент сконструированного бактериофага, очищенный антимикробный пептид (ы) или низкомолекулярный антибиотик. Сконструированные бактериофаги, кодирующие антимикробные пептиды (или сконструированные бактериофаги, кодирующие AMP) могут кодировать любой антимикробный агент, известный специалисту в данной области техники.

[0152] В некоторых вариантах реализации аспектов изобретения сконструированный бактериофаг, кодирующий антимикробный агент, может экспрессировать и секретировать антимикробный агент, который представляет собой нуклеиновую кислоту, например антимикробный агент, который действует посредством «сайлесинга генов» общеизвестных бактериальных генов, известных обычным специалистам в данной области техники. Антимикробный агент на основе

нуклеиновой кислоты включает, например, но без ограничений, молекулы, индуцирующие РНК-интерференцию (РНКи), например, но без ограничений, миРНК, дцРНК, мвРНК, кшРНК, микроРНК и их сконструированные версии, где ген молекулы РНК-интерференции подавляет экспрессию гена, экспрессированного и важного для жизнеспособности (т.е. выживания) бактерий. Антимикробный агент на основе нуклеиновой кислоты может представлять собой антисмысловую олигонуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты, например, но без ограничений, ДНК, РНК, пептид-нуклеиновую кислоту (ПНК), псевдокомплементарную ПНК (пк-ПНК), или закрытую нуклеиновую кислоту (ЗНК) и тому подобное. Альтернативно, антимикробным агентом на основе нуклеиновой кислоты может быть ДНК или РНК и аналоги нуклеиновых кислот, например, ПНК, пкПНК и ЗНК. Нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной и может быть выбрана из группы, включающей нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес белок, олигонуклеотиды, ПНК и т. д. Такие ингибиторы нуклеиновой кислоты включают, например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, который является транскрипционным репрессором, или антисмысловую молекулу, или рибозим, или небольшую ингибирующую последовательность нуклеиновой кислоты, такую как РНКи, кшРНКи, миРНК, микроРНКи (микроРНК), антисмысловой олигонуклеотид и т. д.

[0153] Антимикробные пептиды могут дополнительно или альтернативно быть антибактериальными ферментами. Иллюстративные антибактериальные активности могут включать, но без ограничений, литический фермент, ацилазу, аминопептидазу, амилазу, карбогидразу, карбоксипептидазу, каталазу, целлюлазу, хитиназу, кутиназу, циклодекстрингликозилтрансферазу, дезоксирибонуклеазу, эстеразу, альфа-галактозидазу, бета-галактозидазу, глюкоамилазу, альфа-глюкозидазу, бета-глюкозидазу, галопероксидазу, инвертазу, лакказы, липазу, маннозидазу, оксидазу, пектинолитический фермент, пептидоглутаминазу, пероксидазу, фитазу, полифенолоксидазу, протеолитический фермент, рибонуклеазу, транслугтаминазу, ксиланазу, РНКазу, ДНКазу, лизостафин или порообразующие пептиды.

[0154] Антимикробные пептиды или антимикробные полипептиды

могут непосредственно разрушать бактериальную мембрану путем связывания с отрицательно заряженной микробной мембраной и разрушения мембраны путем образования водных каналов, заставляя липидный бислой сворачиваться назад на себя или покрывая мембрану с образованием мицелл. В дополнение к их прямым бактерицидным эффектам любые антимикробные пептиды и полипептиды могут также активировать TLR-сигналинг и дополнительные иммунные ответы, служить в качестве хемоаттрактантов лейкоцитов, увеличивать бактерицидную опсонизацию путем вторжения фагоцитов, очищать жизненно важные питательные вещества, необходимые бактериям для роста и ингибировать бактериальные протеазы, или любую комбинацию его.

Биосурфактанты

[0155] Образование бактериальной биопленки может приводить к локальным инфекциям, а также к тяжелому лечению, а иногда и к смертельным, системным инфекциям, таким как бактериемия (наличие бактерий в крови) и бактериальный сепсис (множественная органная недостаточность, вызванная распространением бактерий или их продуктов через кровоток). Внеклеточные вещества, которые составляют матрицу биопленки, могут действовать как барьер, который защищает и изолирует бактерии, находящиеся в биопленке от нормальных иммунологических защитных механизмов, таких как антитела и фагоциты, а также от антимикробных агентов, включая антибактериальные ферменты и антибиотики. Биопленка также способствует росту и распространению бактерий, обитающих в биопленке.

[0156] Настоящее изобретение относится к способам получения и композициям сконструированных вирусов, экспрессирующих дополнительный агент, используемый для облегчения удаления или ослабления биопленки, нанесенной на поверхность. Например, композиции могут включать биосурфактант. Типичные биосурфактанты включают, но без ограничений, гликолипиды, липопептиды, депсипептиды, фосфолипиды, замещенные жирные кислоты, липополисахариды, сурлактин, сурфактин, висконсин и рамнолипиды.

Вирусная инженерия

[0157] Методы генетического конструирования вирусных частиц являются трудоемкими и длительными из-за отсутствия широко применимых и целевых методов конструирования *in vitro*. Современные методы *in vivo* могут занять недели или месяцы для создания модифицированных вирусов и вирусных векторов (Levin and Bull, Nat Rev Microbiol., 2004, февраль, 2 (2): 166-73, включены в настоящий документ посредством ссылки). Кроме того, существует токсичность, связанная с манипуляцией вирусными геномами в клетках. До этого раскрытия усилия по разработке широко применимых методов для точной геной инженерии вирусов *in vitro* были в значительной степени безуспешными. В настоящем документе описан широко применимый процесс для быстрого создания вирусных геномов полностью *in vitro*.

[0158] Представленные в настоящем документе системы и методы генетического конструирования *in vitro* имеют несколько преимуществ по сравнению с существующими методами геной инженерии вирусов: 1) позволяют легко манипулировать токсичными генами/продуктами полностью *in vitro*; 2) быстрые, то есть могут быть выполнены в течение дня по сравнению с неделями или месяцами для методов *in vivo*; 3) позволяют удерживать геномную модификацию большей части вирусного генома; 4) не требует рекомбинации сигнальных путей хозяина; 5) более прямой и менее подвержен ошибкам, чем предыдущие методы; и 6) применим к нескольким вирусам без изменений в протоколе.

[0159] Настоящее раскрытие представляет собой способы расщепления, опосредуемой РНК-направляемой нуклеазой, и сборку *in vitro* сайт-специфических сконструированных целых геномов. Настоящее раскрытие значительно увеличивает точность, простоту и скорость, с которой вирусные геномы могут быть генетически модифицированы. Кроме того, данный способ преодолевает сложившуюся сложность манипулирования часто ядовитыми вирусными геномами вируса внутри клеток-хозяев. Также данный подход, выполняемый полностью в условиях *in vitro*, устраняет потребность в генетически приемлемом штамме хозяина для конструирования, что препятствует манипулированию многими важными и интересными вирусами архей,

прокариот и эукариот. Данный подход не усиливает манипуляции вирусными геномами и поэтому позволяет сохранять большинство модификаций вирусного генома, таких как метилирование. Хорошо известно, что модификации генома могут иметь глубокое влияние на пригодность вирусов, и поэтому сохранение данных модификаций генома дает четкое преимущество перед другими инженерными методами. Кроме того, этот метод отличается от других методов, относящихся к конструированию генома РНК-направляемой нуклеазой *in vivo*, поскольку он не сосредоточен на использовании РНК-направляемой нуклеазы, такой как Cas9 и гРНК для редактирования эукариотического генома, но вместо этого относится к преодолению известных проблем вирусной инженерии целиком в условиях *in vitro*.

[0160] В некоторых аспектах, описанные в настоящем документе новые способы могут включать модификацию вирусной нуклеиновой кислоты или вирусного генома, например, используя РНК-направляемую нуклеазу и сборку, описанную в настоящем документе, и введение сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты или сконструированного вирусного генома непосредственно в хозяина, который будет продуцировать сконструированные вирусные частицы или сконструированные вирусы, которые содержат сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту или сконструированный вирусный геном. Например, в некоторых аспектах способы включают конструирование вирусной нуклеиновой кислоты или вирусного генома без введения сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты или сконструированного вирусного генома в клонирующего хозяина для амплификации сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты или сконструированного вирусного генома, например, посредством репликации в векторе. Например, в некоторых способах сконструированная вирусная нуклеиновая кислота или сконструированный вирусный геном не вводятся в дрожжи, *E. coli* или другие известные клонирующие хозяева, такие как, но без ограничений, *Bacillus* или *Vibrio*, до введения сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты или сконструированного вирусного генома в клетку-хозяина, которая будет продуцировать сконструированные вирусные частицы или сконструированные вирусы.

[0161] Новые способы, предложенные в настоящем документе, позволяют проводить целенаправленную модификацию двух, трех, четырех, пяти или более сайтов в вирусном геноме. Способы могут быть выполнены целиком в условиях *in vitro*, что позволяет производить вирусные геномы, измененные в нескольких сайтах, что не достигается с использованием обычных методов конструирования. Приведенные в настоящем документе сконструированные вирусы, содержащие сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту и/или сконструированные вирусные геномы, которые имеют две, три, четыре, пять или более модификаций в отношении несконструированной вирусной нуклеиновой кислоты или несконструированного вирусного генома. Две или более модификаций могут быть вставкой, делецией, заменой или любой их комбинацией. Две или более модификаций могут приводить к одному, двум или более улучшенным вирусным свойствам, таким как любое раскрытое в настоящем документе. Сконструированные вирусы можно получать полностью посредством методов конструирования в условиях *in vitro*, раскрытых в настоящем документе. Способы конструирования *in vitro*, описанные в настоящем документе, приводят к целенаправленным модификациям, в отличие от классического или случайного мутагенеза. В отличие от модификаций, получаемых классическим или случайным мутагенезом, целевые модификации могут быть удобно скринированы для использования в стандартных молекулярно-генетических лабораторных методах, таких как ПЦР и/или секвенирование до любых анализов фенотипа.

[0162] Также в настоящем документе раскрыта система получения синтетических вирусов с улучшенными вирусными свойствами (например, см., фиг. 10). Система включает идентификацию последовательностей нуклеиновых кислот, ответственных за обеспечение требуемого свойства, и затем включение этих изменений последовательности в выбранный вирусный геном для получения вирусных частиц с улучшенными вирусными свойствами. Последовательности нуклеиновой кислоты, способные придавать желаемое вирусное свойство, могут быть идентифицированы с помощью фундаментальных научных знаний, поиска литературы, эмпирического тестирования, исследований мутаций или любой их комбинации.

Исследования мутаций могут включать эволюционные исследования, исследования адаптации, исследования мутагенеза и/или другие экспериментальные подходы, хорошо известные в данной области техники. Исследования мутагенеза могут включать ультрафиолетовый (УФ), химический и/или инсерционный мутагенез. Инсерционный мутагенез может включать транспозон и/или селективный маркер инсерционного мутагенеза. Эксперименты по мутации, используемые для идентификации интересующих последовательностей нуклеиновых кислот, могут быть выполнены с использованием вируса или вирусного генома вируса, который станет отправной точкой для конструирования *in vitro*. Дополнительно или альтернативно вместо выбранного вируса или вирусного генома, связанный или гетерологичный вирус, или вирусный геном может быть использован в исследовании мутаций с целью идентификации последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот для включения в первоначально выбранный вирус или вирусный геном для придания дополнительных свойств выбранного вируса.

[0163] Желаемые свойства могут включать одно или более из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунологического надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагу, антибиотической сенсibilизации бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина, других необходимых свойств, которые могут быть хорошо известны специалисту в данной области техники или в любой их комбинации. Идентифицированные последовательности нуклеиновых кислот, обладающие необходимым свойством, могут быть включены в выбранный вирусный геном, используя описанный в настоящем документе метод конструирования *in vitro* для включения одного или более изменений в один вирусный геном в течение одного или более циклов повторного конструирования и тестирования до тех пор, пока не будет подтвержден желаемый набор одного или более улучшенных вирусных свойств. Конечный вирусный геном, представляющий интерес, может представлять собой комбинацию

естественных и синтезированных молекул нуклеиновых кислот или может быть полностью синтезирован *de novo* с использованием способов, описанных в настоящем документе, и/или известных в данной области техники. Получение вирусов или вирусных частиц с улучшенными вирусными свойствами может включать введение сконструированного вирусного генома, представляющего интерес, в совместимую клетку, причем геном активируется, тем самым создавая вирусные частицы или вирусы. Для получения молекулы нуклеиновой кислоты, идентифицированной для придания желаемого свойства для включения в выбранный вирусный геном, последовательность, представляющая интерес, может быть выделена или амплифицирована из вирусного генома, из которого она была идентифицирована путем расщепления, ПЦР-амплификации, синтеза, других методов известных в данной области техники, или в любой их комбинации. Синтезированную последовательность нуклеиновой кислоты можно химически синтезировать или собрать из химически синтезированных перекрывающихся олигонуклеотидов. Дополнительно или альтернативно, молекула нуклеиновой кислоты, которая должна быть включена в выбранный вирусный геном для того, чтобы придать желаемый фенотип, может быть комбинацией последовательностей естественных и синтезированных нуклеиновых кислот. В зависимости от конструкции молекулы нуклеиновой кислоты, которая должна быть включена в выбранный вирусный геном, полученный сконструированный вирусный геном может содержать последовательности нуклеиновых кислот, замененные альтернативными последовательностями или любой их комбинацией для придания необходимого вирусного свойства. Способы конструирования молекул нуклеиновой кислоты для того, чтобы изменить последовательность таким образом, что последовательности выделяют, удаляют, заменяют или любую их комбинацию хорошо известную специалистам в данной области техники. Сконструированные вирусные геномы, получаемые при помощи системы и методами, описанными в настоящем документе, могут быть использованы для получения вирусов или вирусных частиц с улучшенными вирусными свойствами. Получение вирусов или вирусных частиц с улучшенными вирусными свойствами может включать введение

сконструированного вирусного генома в совместимую клетку, причем геном активируется, тем самым создавая вирусные частицы или вирусы. Введение сконструированного генома в клетку может быть осуществлено путем электропорации, трансформации, конъюгации, контакта клетки с предварительно упакованными вирусными геномами и т. д. или другими способами, хорошо известными в данной области техники.

[0164] Настоящее раскрытие дополнительно относится к открытию способа для конструирования нуклеиновой кислоты *in vitro* с использованием РНК-направляемой эндонуклеазы. Настоящее раскрытие дополнительно относится к улучшению вирусных свойств при помощи генной инженерии *in vitro* вирусных нуклеиновых кислот. В частности, раскрытие относится к расщеплению *in vitro* последовательностей вирусов с использованием эндонуклеаз, таких как РНК-направляемая эндонуклеаза, например, Cas9, с последующей сборкой рекомбинантной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента(ов) ДНК или РНК в расщепленный вирусный геном.

[0165] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* вирусной нуклеиновой кислоты, включающий выделение вирусной нуклеиновой кислоты; расщепление *in vitro* области вирусной нуклеиновой кислоты с использованием РНК-направляемой нуклеазы; и сборку рекомбинантной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента ДНК или РНК в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых примерах расщепление *in vitro* представляет собой ферментативное расщепление, основанное на РНК. В некоторых примерах ферментативное расщепление выполняют при помощи РНК-направляемой нуклеазы. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9, фермент, полученный из Cas9, фермент, связанный с Cas9, или любую очищенную программируемую РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых примерах расщепление дополнительно включает нацеливающие РНК. В некоторых примерах система расщепления дополнительно содержит спермидин. В некоторых примерах нацеливающие РНК представляют собой гРНК, crРНК и/или tracrРНК. В некоторых примерах после расщепления РНК-направляемую нуклеазу инактивируют стандартными методами, такими

как воздействие тепла и/или удалением стандартными методами, такими как, например, фенольно-хлороформной экстракцией. В некоторых примерах нагревание в процессе активации достигается путем воздействия на раствор, содержащий белок, нагревая, например, по меньшей мере на 80° Цельсия.

[0166] Любая программируемая РНК-направляемая нуклеаза может быть использована в способах и композициях настоящего изобретения, например, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известна как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3 или их гомологи, или их сконструированные варианты. Любую программируемую систему CRISPR можно использовать в способах и композициях в настоящем документе, включая тип I, тип II, тип III, тип IV, тип V, тип VI или любую их комбинацию. РНК-направляемая нуклеаза может быть белком Cas9, таким как белок Cas9 из *Staphylococcus pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. pneumonia*, *S. aureus* или *Neisseria meningitidis*, в виде неограничивающих примеров. Также рассматриваются белки Cas9, представленные в виде SEQ ID NO: 1-256 и 795-1346 в публикации заявки на патент США № US 2014/0068797, включенной в настоящий документ посредством ссылки, и химерных белков Cas9, которые могут объединять домены из более чем одного белка Cas9, а также варианты и мутанты идентифицированных белков Cas9. В дополнение к Cas9, специалист в данной области техники легко узнает, что любой известный функциональный эквивалент будет достаточным альтернативным примером.

[0167] Вирусные частицы могут быть архей-, прокариот- или эукариот- специфическими вирусами. Например, вирус может быть таким, который может заразить *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* или *Homo sapiens*. В некоторых примерах вирус может быть таким, который заражает виды возбудителей, такие как те, что относятся к роду *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pseudomonas*,

Salmonella, *Staphylococcus* или *Streptococcus*. В некоторых примерах вирус может инфицировать виды архей, такие как те, что относятся к роду *Acidianus*, *Aeropyrum*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Methanobacterium*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Stygiolobus*, *Sulfolobus* или *Thermoproteus*. В некоторых примерах вирус может инфицировать эукариотические хозяева, такие как люди, млекопитающие, животные, растения, водоросли или грибы. Вирусная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. В некоторых примерах вирусная нуклеиновая кислота состоит из цельного вирусного генома, части вирусного генома, или одного или более вирусных генов. В некоторых примерах часть вирусного генома субклонировается в плазмиду до конструирования.

[0168] Вирусная нуклеиновая кислота может быть одиночной или двойной (или более) расщепленной РНК-направляемой нуклеазой, такой как Cas9, в сочетании с нацеливающей(ими) РНК *in vitro* для удаления одного или более нуклеотидов, одного гена, множества генов или любого размера геномной области или открытой ДНК для вставки новой последовательности. В дополнение к Cas9 специалисту в данной области техники понятно, что любая программируемая РНК-направляемая нуклеаза или другой механизм расщепления ДНК, пригодный для ДНК, будет достаточным и будет функционально эквивалентным. Множественные расщепления могут быть выполнены одновременно; однако было обнаружено, что последовательное расщепление РНК-направляемой Cas9 может повысить эффективность. Кроме того, спермидин может быть добавлен в реакционную смесь для увеличения диссоциации Cas9 от ДНК, что позволяет увеличить доступность Cas9 для ферментативной активности. Вирусная последовательность, удаленная расщеплением Cas9, не рекомбинируется обратно в геном, потому что Cas9 представляет собой тупой режущий фермент и фрагменты не содержат гомологии с сайтом встраивания. Кроме того, дезактивация теплом Cas9 обеспечивает непосредственный переход от расщепления к реакциям сборки, упрощая протокол.

[0169] Используемый в настоящем документе термин «нацеливающие РНК» или «направляющие РНК» относится к CRISPR РНК

(crPНК), транс-активирующим crPНК (crPНК), модифицированным химерным гидовым PНК (гPНК), включающим как crPНК, так и tracrPНК, или одиночные гPНК, совместимые с выбранной системой CRISPR. CRISPR PНК (crPНК) транскрибируют из локуса CRISPR, включают в эффекторные комплексы и направляют комплекс к последовательностям встраиваемой нуклеиновой кислоты, что приводит к расщеплению нуклеиновой кислоты, опосредованному PНК-направляемой нуклеазой. TracrPНК являются комплементарными с и комплементарной парами оснований с pre-crPНК, образующими дуплекс PНК, необходимый для Cas9-опосредованного расщепления. Гибридные гPНК представляют собой химерные PНК, которые связывают нацеливающую crPНК с tracrPНК, что позволяет использовать одну PНК для Cas9-опосредованного расщепления. Cas9-опосредованное расщепление могут проводить как с транскрибированной *in vitro* смесью crPНК-tracrPНК или с химерной гPНК.

[0170] Вставка ДНК или PНК может быть получена любыми способами, известными в данной области техники, а именно путем синтеза *in vitro*, химического синтеза, синтеза *de novo*, сборки *de novo*, амплификации (ПЦР), фермент-опосредуемого освобождения от плазмид, вирусов или бактерий, или любой их комбинации. В одном аспекте вставка ДНК или PНК создается сборкой олигонуклеотидов или ПЦР с праймерами, содержащими перекрывающиеся последовательности с сайтом встраивания. Вставка ДНК или PНК может быть комбинацией естественных и синтезированных нуклеиновых кислот, или полученных полностью естественным или синтетическим путем.

[0171] Сборка вставки ДНК или PНК и расщепленной вирусной нуклеиновой кислоты может быть проведена любым известным в данной области техники способом, таким как реакции клонирования *in vitro* или любым из ранее обсуждавшихся способов. В одном аспекте сборка вставки ДНК или PНК в расщепленный вирусный геном выполняют с использованием метода сборки Gibson Assembly. В одном аспекте сборку вставки ДНК или PНК в расщепленный вирусный геном выполняют *in vivo* с использованием механизмов рекомбинации клеток-хозяев. Сборка вставки ДНК или PНК может приводить к вставке, делеции, замене или любой их комбинации последовательности нуклеиновой

кислоты. Процесс конструирования последовательности ДНК или РНК такой, что сборка в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту приводит к вставке, делеции, замене или любой их комбинации нуклеиновых кислот, представляющих интерес, хорошо известны в данной области техники.

[0172] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* вирусной последовательности, включающий выделение вирусной нуклеиновой кислоты; расщепления *in vitro* области вирусной нуклеиновой кислоты с использованием РНК-направляемой нуклеазы; и сборку рекомбинантной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента ДНК или РНК в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых примерах сборку проводят *in vitro* в одном сосуде со смесью компонентов, включающих (а) выделенную не термостабильную 5'-3'-эксонуклеазу, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью, (b) краудинг-агент, (с) выделенную термостабильную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-эксонуклеазной активностью или смесью указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью, (d) выделенную термостабильную лигазу, (е) смесь дНТФ и (f) подходящий буфер в условиях, эффективных для вставки фрагмента в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту с образованием рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу T5, и приведение в контакт происходит в изотермических условиях, и/или краудинг-агент представляет собой ПЭГ, и/или невытесняющая ДНК-полимераза представляет собой ДНК-полимеразу Phusion™ или ДНК-полимеразу VENT® и/или лигазу представляет собой Taq-лигазу. В некоторых примерах сборку *in vitro* выполняют при помощи одноступенчатой или изотермической сборки методом Gibson Assembly. В некоторых примерах сборку *in vitro* выполняют при помощи двухступенчатой сборки методом Gibson Assembly. В некоторых примерах расщепленная нуклеиновая кислота и фрагмент ДНК или РНК могут быть собраны *in vitro* лигированием тупых концов с использованием фермента лигазы.

[0173] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает метод *in vitro* для конструирования вирусной последовательности,

включающий этап сборки. В некоторых примерах сборку выполняют *in vivo* в совместимой клетке-хозяине с использованием механизма рекомбинации клеток-хозяев. Хотя рекомбинантная нуклеиновая кислота может быть собрана целиком в условиях *in vitro* с использованием очищенных ферментов, как описано в настоящем документе, этот процесс также может быть осуществлен с использованием естественных или сконструированных рекомбинантных сигнальных путей в чувствительном штамме хозяина. В некоторых случаях совместимыми клетками-хозяевами могут быть *S. cerevisiae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *V. natrigens* или другие организмы, доступные в данной области техники. Трансформация очищенных и обработанных *in vitro* вирусных геномов вместе с фрагментом вставки восстановления, содержащим концевые области гомологии, достаточна для того, чтобы некоторые клетки-хозяева собирали рекомбинантный вирусный геном *in vivo*. Фрагменты вставки восстановления могут быть синтезированы или амплифицированы стандартными методами, известными в данной области техники, или могут находиться внутри плазмид, стабильно реплицирующихся в выбранной клетке-хозяине. Данный способ, вероятно, будет иметь более низкую эффективность по сравнению со сборкой *in vitro* из-за клеток-хозяев, имеющих как гомологичные, так и не гомологичные пути восстановления ДНК, задача совместной доставки достаточного количества вставки и расщепленного генома в клетку-хозяина и более низкой эффективности большинства гомологичных сигнальных путей рекомбинации хозяина. Поскольку только расщепленные геномы не образуют функциональных вирусных частиц и в последующем бляшек без опосредованной хозяином рекомбинации, бляшки, полученные после трансформации и выращивания, могут быть скринированы с помощью ПЦР для данной вставки, чтобы подтвердить корректную сборку желаемой сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты.

[0174] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает метод *in vitro* для конструирования вирусной последовательности, содержащей РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 II типа. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 или

фермент, полученный из Cas9. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой выделенный рекомбинантный фермент Cas9 или Cas9. В некоторых примерах существует по меньшей мере одна нацеливающая РНК. В некоторых примерах существует две нацеливающие РНК. В некоторых примерах нацеливающая РНК представляет собой химерную гидовую РНК (гРНК) или набор crРНК и tracrРНК. В некоторых примерах в реакции расщепления *in vitro* использует две гРНК. В некоторых примерах в реакции расщепления *in vitro* использует два набора crРНК и tracrРНК, чтобы, например, одновременно нацеливать на две последовательности.

[0175] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* вирусной последовательности, включающий стадию расщепления *in vitro*. В некоторых примерах после расщепления РНК-направляемую нуклеазу инактивируют при помощи стандартных методов, таких как воздействие теплом, например, по меньшей мере на 80° Цельсия. В некоторых примерах, после расщепления, РНК-направляемую нуклеазу удаляют фенольно-хлороформной экстракцией. В некоторых примерах, после расщепления, РНК-направляемую нуклеазу удаляют другими способами экстракции, хорошо известными в данной области техники.

[0176] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ *in vitro* для конструирования вирусной последовательности, которая приводит к созданию сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту затем трансформируют в клетку-хозяин. В некоторых примерах клетка-хозяин представляет собой *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *V. natriegens*, *B. subtilis* или другой организм, хорошо известный в данной области техники. В некоторых примерах трансформацию выполняют путем теплового шока, электропорации, биолистики, бомбардировки частиц, конъюгации, трансдукции, липофекции или другого известного метода, хорошо известного в данной области техники. В некоторых примерах сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту трансформируют в клетку-хозяина и затем снова выделяют после репликации. В некоторых примерах выделенную сконструированную вирусную

нуклеиновую кислоту используют в качестве исходной вирусной нуклеиновой кислоты для другого цикла конструирования *in vitro*, который в настоящем документе называется итеративное конструирование *in vitro*. В некоторых примерах представлен один цикл итеративного конструирования *in vitro*. В других примерах представлен по меньшей мере один цикл итеративного конструирования *in vitro*. В других примерах существует два или более циклов итеративного конструирования *in vitro*.

[0177] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ *in vitro* конструирования вирусной последовательности, который приводит к созданию сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту упаковывают в вирусные частицы с использованием набора для упаковки *in vitro*, который может быть коммерчески доступен. В некоторых примерах комплект для упаковки *in vitro* представляет собой набор Maxplax lambda packaging extract.

[0178] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ *in vitro* для конструирования вирусной последовательности, который приводит к образованию рекомбинантной сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах сконструированная вирусная нуклеиновая кислота улучшает или изменяет свойство вируса по сравнению с контрольным и/или несконструированным вирусом. В некоторых примерах улучшенное или измененное вирусное свойство представляет собой свойство, такое как круг хозяев, вирусный литический цикл, адсорбция, прикрепление, инъекция, репликация и сборка, лизис, величина выхода фага, ускользание от иммунологического надзора, иммунная стимуляция, иммунная дезактивация, дисперсия биопленки, устойчивость к бактериальному фагу, антибиотическая сенсibilизация бактерий, модуляция факторов вирулентности, направленное расщепление или редактирование геном хозяина или любая их комбинация. В некоторых примерах улучшение свойства может быть увеличением, уменьшением или изменением свойства. Например, улучшенное вирусное свойство может быть расширенным или

уменьшенным кругом хозяев, измененным вирусным литическим циклом, увеличенной или уменьшенной адсорбцией в клетке-хозяине, увеличенным или уменьшенным прикреплением к клетке-хозяина, увеличенным или уменьшенным инъекцией, увеличенной или уменьшенной или измененной репликацией и сборкой, повышенным или сниженным лизисом, увеличенной или уменьшенной величиной выхода фага, увеличенным или уменьшенным или измененным ускользанием от иммунного надзора, увеличенной или уменьшенной или измененной иммунной стимуляцией, увеличенной или уменьшенной или измененной иммунной дезактивацией, увеличенной или уменьшенной или измененной дисперсией биопленки, увеличенной или уменьшенной или измененной устойчивости бактерий к фагу, повышенной или уменьшенной или измененной антибиотической сенсibiliзацией бактерий, увеличенной или уменьшенной или измененной модуляцией факторов вирулентности, увеличением или уменьшением или изменением направленного расщепления или редактирования генома или любой их комбинации.

[0179] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, увеличенный круг хозяев. Круг хозяев представляет собой количество типов клеток, штаммов или видов хозяев, которые вирус может заразить. Увеличение круга хозяев представляет собой расширение абсолютного числа различных типов клеток, штаммов или видов, которые вирус способен инфицировать по сравнению с контрольным и/или несконструированным вирусом. В некоторых примерах увеличенный круг хозяев представляет собой увеличение количества бактериальных штаммов или вариантов внутри бактериальных видов, которые вирус способен инфицировать. Увеличение в круге хозяев может быть увеличением по меньшей мере одного или более штаммов, типов клеток или видов. Круг хозяев могут анализировать, например, стандартным анализом бляшкообразования, который хорошо известен в данной области техники.

[0180] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ для конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например,

вирусный литический цикл. Вирусный литический цикл представляет собой один из двух циклов вирусной репликации, другой является лизогенным циклом. Литический цикл приводит к разрушению инфицированной клетки и инфицированной клеточной мембраны. Литический цикл состоит из шести этапов, каждый из которых может быть индивидуально сконструирован. Шесть этапов вирусного литического цикла представляют собой адсорбцию, прикрепление, инъекцию, репликацию и сборку, лизис и величину выхода фага.

[0181] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, адсорбция. Адсорбция представляет собой действие вируса, контактирующего с клеткой-хозяином. Вирусная адсорбция характеризуется как сродство вируса к данной клетке-хозяину и может быть проанализировано с помощью стандартных анализов адсорбции, например, описанных Хайманом и Абедоном (*Methods in Molecular Biology*, 2009). Кроме того, или, альтернативно, вирусная адсорбция может быть определена другими стандартными анализами аффинности, широко используемыми в биохимии для анализа взаимодействий рецептор-лиганд.

[0182] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, прикрепление. Вирусное прикрепление – это когда вирус сильно прикрепляется к клетке-хозяина. Вирусное прикрепление является необратимым взаимодействием между вирусом и рецептором клетки-хозяина.

[0183] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, инъекция. Введение относится к инъекции вирусного генома, и когда вирус вставляет свой генетический материал в клетку-хозяина. В качестве примера можно привести инъекцию вирусного генома путем измерения оттока ионов калия (Cady et al., *J. Bacteriol*, 2012, 194 (21): 5728-38; Leavitt et al., *PLoS ONE*, 2013 8 (8): E70936.,

которые включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте).

[0184] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, репликация и сборка. Вирусная репликация и сборка относятся к созданию новых вирусов в клетке-хозяина. После инъекции вирусного генома механизм клеток-хозяев захватывается и вирусные гены транскрибируются, вирусные белки транслируются, а вирусные частицы представляют собой сборку, содержащую реплицированные вирусные геномы. Вирусная репликация и сборка в конечном итоге приводят к лизису клеток-хозяев, поэтому репликацию и сборку можно анализировать, контролируя скорость роста вируса стандартным анализом бляшкообразования или анализом бляшкообразования в двойном агаровом слое. Скорости вирусной репликации могут дополнительно или альтернативно определяться путем измерения величины выхода фага в стандартном анализе бляшкообразования, кривой одиночного цикла размножения или других стандартных анализах на репликативную способность вируса, которые хорошо известны в данной области техники.

[0185] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, лизис. Лизис относится к лизису клеток-хозяев. После репликации и сборки новых вирусных частиц образуется фермент, который разрушает стенку клетки-хозяина и/или клеточную мембрану изнутри и позволяет вводить жидкость, что в конечном итоге приводит к лизису клеток-хозяев. Способность увеличивать или ингибировать вирулентную репликацию вируса может увеличивать или уменьшать время, необходимое для того, чтобы данный вирус убивал клетку-хозяина путем лизиса. Вирусную вирулентность можно исследовать, анализируя время между заражением и лизисами клеток-хозяев, контролируя скорость роста вируса стандартным анализом бляшкообразования или анализом бляшкообразования в двойном агаровом слое. Кроме того, или альтернативно, усиленный бактериальный лизис

сконструированного вируса по сравнению с контрольным и/или несконструированным вирусом может быть определен при помощи колониеобразующих единиц (КОЕ) после анализа, количества или диаметра бляшкообразующих единиц (БОЕ) или после анализа бляшкообразования, из анализа биопленки или других стандартных анализов, которые хорошо известны в данной области техники.

[0186] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ модификации вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, величина выхода фага. Величина выхода фага относится к числу вирусов, продуцируемых зараженной клеткой. Величина выхода фага может быть проанализирована стандартными анализами величина выхода фага, такими как те, которые описаны Элвисом и Делбрейком (J Gen Physiol. 1939 Jan 20; 22(3): 365-384, включенный в настоящий документ посредством ссылки) и Delbriick (Delbriick, J. Gen. Physiol, 1940, 23; 643, включенный в настоящий документ посредством ссылки)

[0187] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ модификации вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, ускользание от иммунного надзора. Ускользание от иммунного надзора представляет собой способность вируса избегать клиренса врожденной или адаптивной иммунной системы. Ускользание от иммунного надзора может быть проанализировано путем изучения уровня или скорости нейтрализации продуцирования антител. Кроме того, или, альтернативно, ускользание от иммунного надзора можно измерить, анализируя период полужизни или времени пребывания данного вируса внутри животного.

[0188] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает собой способ модификации вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, иммунная стимуляция. Иммунная стимуляция представляет собой способность вируса индуцировать иммунный ответ, который обычно не ассоциируется с вирусом дикого типа или несконструированным вирусом. Это может быть проанализировано путем анализа иммунных факторов, продуцируемых в присутствии вируса, с использованием

стандартных наборов ИФА, проточной цитометрии, гистологии или других стандартных иммунологических анализов, известных специалистам в данной области техники.

[0189] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ модификации вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, иммунная дезактивация. Иммунная дезактивация представляет собой способность вируса уменьшать иммунный ответ, обычно связанный с вирусом дикого типа или несконструированным вирусом. Это может быть проанализировано путем анализа иммунных факторов, продуцируемых в присутствии вируса, с использованием стандартных наборов ИФА, проточной цитометрии, гистологии или других стандартных иммунологических анализов, известных специалистам в данной области техники.

[0190] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ модификации вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, дисперсия биопленки. Дисперсия биопленки представляет собой способность деградировать, ослаблять или увеличивать проницаемость биопленки. Мероприятия, которые могут приводить к дисперсии биопленки, включают, но без ограничений, деградацию экзополисахарида (ЭПС), модуляцию молекул бактериального чувства кворума, и деградацию внеклеточной ДНК или РНК в биопленке или месте бактериальной инфекции. «Деградация экзополисахарида» представляет собой способность вируса продуцировать белок или фермент, способный разрушать или диссоциировать высокомолекулярные соединения, секретируемые микроорганизмами в их среду для формирования структурной целостности биопленок. ЭПС-деградирующая активность может включать, но без ограничений, поверхностно-активные вещества, гликозидазы и протеазы. Их активность может быть измерена с использованием стандартных биохимических анализов, известных специалистам в данной области техники. Модуляция молекул бактериального чувства кворума также может приводить к дисперсии биопленки. Известно, что молекулы бактериального чувства кворума являются высококонсервативными регуляторами вирулентности у ряда

патогенных бактерий человека. Были идентифицированы белки с ферментативной активностью, способные разрушать молекулы бактериального чувства кворума, и их активность измеряли при помощи различных анализов микробных репортеров, биохимических репортерных анализов или путем анализа продуктов расщепления с использованием TLC (Rajesh and Rai, Microbiological Research, July- August 2014, Volume 169, Issues 7-8, Pages 561-569, включенные в настоящий документ посредством ссылки). Деградация внеклеточной ДНК или РНК в биопленке или месте бактериальной инфекции также может привести к дисперсии биопленки. Активность вирусной закодированной ДНКазы или РНКазы может быть измерена с помощью имеющихся в продаже наборов, известных специалистам в данной области техники, таких как те, что доступны от Jena Bioscience или Thermofisher в качестве неограничивающих примеров. Предотвращение, проникновение, разрушение или дисперсия биопленки также может быть оценена путем количественной оценки биопленки, присутствующей после обработки, и сравнения ее с контрольным условием. Измерения биопленки хорошо известны в данной области техники и включают в качестве неограничивающего примера окрашивание биопленки красителем, таким как кристаллический фиолетовый, и количественное определение поглощения на спектрофотометре.

[0191] В некоторых примерах настоящее раскрытие обеспечивает способ модификации вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшенному вирусному свойству, такому как, например, устойчивость бактериального фага. Фаг или бактериофаг представляют собой термины, которые можно использовать взаимозаменяемо и которые относятся к вирусам, которые заражают бактерии. Бактериальная устойчивость к фагу относится к появлению бактериофаг-устойчивых бактерий из популяции, обработанной или подверженной воздействию конкретного вируса. Это происходит либо посредством случайных мутаций внутри бактерий, либо из-за того, что некоторые бактерии внутри популяции не способны заразиться вирусом. Когда данные резистентные бактерии распространяются, новая популяция устойчива к вирусу или бактериофагу, изначально

подвергаемому воздействию. Неограничивающим примером оценки устойчивости бактерий является отслеживание скорости роста бактерий после вирусной обработки, поскольку количество резистентных бактерий непосредственно влияет на скорость повторного роста популяции. Бактериофаг может быть модифицирован таким образом, чтобы бактерии не могли получить вирусную резистентность по меньшей мере тремя способами, включая 1) ингибирование известных систем устойчивости к вирусам, 2) кодирование вторичного токсина и/или 3) увеличение вирулентности за счет увеличения литической способности. Бактериофаг может избегать или ингибировать известные системы устойчивости к вирусам посредством экспрессии известных или синтетических ингибирующих белков, как один пример. Активность данных ингибирующих белков можно контролировать с помощью классического метода титрования на двухслойной бляшке и/или анализа эффективности культивирования. Системы устойчивости к вирусам могут включать, но без ограничений, системы CRISPR-Cas и рестрикции-модификации. Предотвращение устойчивости к вирусам также может быть достигнуто путем экспрессии вторичных токсинов, таких как бактерицидные полезные нагрузки. Активность данных вторичных токсинов не зависит от естественной литической активности данного вируса и может быть измерена анализом кривой роста/гибели. Кроме того, или альтернативно, генетически закодированный токсический белок может быть очищен и охарактеризован с использованием установленных биохимических и/или фенотипических анализов, обычно используемых для характеристики белковых токсинов и которые хорошо известны специалисту в данной области техники.

[0192] В некоторых примерах настоящее раскрытие обеспечивает способ модификации вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, антибиотическая сенсibilизация бактерий. «Антибиотическая сенсibilизация бактерий» относится к способности вируса экспрессировать генетически закодированную полезную нагрузку, чтобы сделать инфицированные или соседние клетки более чувствительными к антимикробному агенту. Полезная нагрузка может

быть генетически закодирована на вирусе или бактериофаге, а затем экспрессирована внутри клетки-хозяина. Экспрессированная полезная нагрузка может быть необязательно секретирована клеткой-хозяином или высвобождена при лизисе клеток-хозяев. Активность антибиотической сенсibilизации бактерий можно наблюдать при помощи тестирования синергии, используя, например, хорошо известный метод микроразведений с использованием серийных разведений.

[0193] В некоторых примерах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, модуляция факторов вирулентности. «Модуляция факторов вирулентности» относится к вирусным генетически закодированным белкам или соединениям, способным модулировать экспрессию или активность известных факторов вирулентности. Неограничивающими примерами модуляторов факторов вирулентности являются факторы транскрипции, антитела и белки иммунитета. Экспрессию или активность факторов вирулентности и модуляторов фактора вирулентности можно наблюдать, например, на животных моделях, биохимических тестах или репортерных анализах.

[0194] В некоторых примерах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования вирусной нуклеиновой кислоты, который приводит к улучшению вирусного свойства, такого как, например, направленное расщепление или редактирование генома хозяина. «Расщепление или редактирование целевого генома хозяина» относится к способности вируса генетически кодировать специфичную для последовательности нуклеазу, способную целенаправленно расщеплять геном в данном генетическом локусе, и, необязательно, редактировать, например, путем вставки восстанавливающей молекулы ДНК. Активность целевого расщепления можно наблюдать путем секвенирования, определения количества жизнеспособных микроорганизмов, подтверждения интеграции новой последовательности и/или других стандартных методов, известных специалистам в данной области техники.

[0195] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* вирусной последовательности,

включающий этап расщепления *in vitro*. В некоторых примерах расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту выделяют и секвенируют вместо использования в реакции сборки *in vitro* или *in vivo*. В некоторых примерах результаты секвенирования из фрагмента вирусной нуклеиновой кислоты используют для определения концов вирусных геномов. В некоторых примерах скорректированные последовательности вирусного генома используют для планирования и разработки дальнейших подходов и этапов конструирования *in vitro*.

[0196] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу конструирования *in vitro* вирусной последовательности, включающей выделение вирусной нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах вирусная нуклеиновая кислота представляет собой полный вирусный геном. В некоторых примерах полный вирусный геном выделяют из вирусной частицы. В некоторых примерах вирусная нуклеиновая кислота представляет собой часть вирусного генома. В некоторых примерах вирусная нуклеиновая кислота представляет собой часть вирусного генома, содержащегося в плазмиде. В некоторых примерах плазмиду, содержащую часть вирусного генома, выделяют из клетки-хозяина. В некоторых примерах часть вирусного генома клонировали в плазмиду, трансформировали в клетку-хозяина и изолировали перед конструированием *in vitro*. В некоторых примерах вирусную нуклеиновую кислоту синтезируют *de novo*. Синтез *de novo* может включать синтез олигонуклеотидов и сбор их *in vitro* или *in vivo* с использованием стандартных методов, известных в данной области техники. В некоторых примерах вирусную нуклеиновую кислоту амплифицируют перед расщеплением, таким как, например, с ПЦР-амплификацией.

[0197] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает набор для конструирования вирусной последовательности, включающий (a) выделенную нетермостабильную 5'-3'-экзонуклеазу, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью, (b) краудинг-агент, (c) выделенную термостабильную непересекающаяся ДНК-полимеразу с 3'-экзонуклеазной активностью или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью, (d) выделенную термостабильную лигазу, (e) смесь дНТФ

(f) подходящий буфер и (g) очищенную рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9. В некоторых примерах набор дополнительно содержит специально разработанные нацеливающие РНК. В некоторых примерах нацеливающие РНК представляют собой химерные гРНК или crРНК и tracrРНК. В некоторых примерах набор дополнительно содержит специально разработанные синтезированные молекулы нуклеиновой кислоты, предназначенные для использования в качестве вставленного фрагмента ДНК в реакции сборки. В некоторых примерах набор дополнительно содержит компетентные клетки-хозяева. В некоторых примерах набор дополнительно содержит выделенные вирусные нуклеиновые кислоты.

[0198] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает систему для конструирования *in vitro* вирусной нуклеиновой кислоты, содержащей выделенную вирусную нуклеиновую кислоту, рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу, по меньшей мере одну нацеливающую РНК и фрагмент ДНК или РНК, которые будут собраны в выделенную вирусную нуклеиновую кислоту в сайте расщепления. В некоторых примерах выделенная вирусная нуклеиновая кислота представляет собой полный геном, выделенный из вирусных частиц. В некоторых примерах выделенная вирусная нуклеиновая кислота представляет собой часть вирусного генома, который субклонируется в плазмиду и выделяется из клетки-хозяина. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9. В некоторых примерах нацеливающая РНК представляет собой crРНК и tracrРНК. В некоторых примерах нацеливающая РНК представляет собой химерную гибридную РНК (гРНК). В некоторых примерах существует две нацеливающие РНК или гРНК. В некоторых примерах имеется два набора crРНК и tracrРНК.

[0199] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает систему сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты *in vitro*, содержащую: выделенную вирусную нуклеиновую кислоту, рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу, по меньшей мере одну нацеливающую РНК и фрагмент нуклеиновой кислоты, который должен

быть вставлен в сайт расщепления выделенной нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах система такова, что рекомбинантная РНК-направляемая нуклеаза и по меньшей мере одна нацеливающая РНК образуют комплекс, способный расщеплять выделенную вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых примерах система дополнительно содержит спермидин. В некоторых примерах система дополнительно содержит: выделенную нетермостабильную 5'-3'-экзонуклеазу, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; краудинг-агент; выделенную термостабильную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-экзонуклеазной активностью или смесью указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; выделенную термостабильную лигазу; смесь дНТФ; и подходящий буфер, в котором система находится в условиях, эффективных для вставки фрагмента нуклеиновой кислоты в выделенную вирусную нуклеиновую кислоту в месте расщепления РНК-направляемой нуклеазы с образованием рекомбинантной вирусной нуклеиновой кислоты.

[0200] В некоторых аспектах система, описанная в настоящем документе, такова, что рекомбинантная вирусная нуклеиновая кислота способна продуцировать не встречающиеся в природе вирусные частицы по меньшей мере с одним улучшенным вирусным свойством по сравнению с эталонной и/или несконструированной вирусной нуклеиновой кислотой. В некоторых примерах улучшенное вирусное свойство выбирают из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунного надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотикочувствительности бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[0201] В некоторых аспектах в системе, описанной в настоящем документе, РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9. В некоторых примерах РНК-направляемую нуклеазу инактивируют или удаляют после расщепления.

[0202] Способ, описанный в настоящем документе, может быть использован в нескольких других вирусных геномах и вирусных векторных конструкциях, используемых для модификации геномов РНК путем прямого редактирования генома РНК или ДНК-матрицы, который затем будет транскрибироваться *in vitro* в вирусную РНК, используемую для конструирования и непосредственного изменения вирусов как прокариотов, так и эукариотов, и используется для непосредственной модификации вирусных геномов, используемых для отображения фагов, фаговой терапии, вирусной диагностики или разработки/производства вакцин.

[0203] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает рекомбинантную вирусную нуклеиновую кислоту, вырабатываемую любым из способов, описанных в настоящем документе. В некоторых примерах рекомбинантная вирусная нуклеиновая кислота способна продуцировать не встречающиеся в природе вирусные частицы с по меньшей мере одним улучшенным вирусным свойством по сравнению с несконструированной вирусной нуклеиновой кислотой. В некоторых примерах улучшенное вирусное свойство выбирается из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунного надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотикочувствительности бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[0204] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает сконструированную вирусную композицию, содержащую рекомбинантную нуклеиновую кислоту, способную продуцировать не встречающиеся в природе вирусные частицы по меньшей мере с одним улучшенным вирусным свойством по сравнению с несконструированной вирусной нуклеиновой кислотой. В некоторых примерах улучшенное вирусное свойство выбирают из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунного надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии

биоупленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотикочувствительности бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина. В некоторых примерах сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением получают любым из этапов, описанных в настоящем документе, способов.

[0205] Данный способ может быть использован для изменения нуклеотида, гена или цельной геномной области. Например, как описано в приведенных ниже примерах, данный способ, как было показано, заменяет ген *gp18* LKD16 на LUZ19, что приводит к улучшению чувствительности к кругу вирусных хозяев. Кроме того, данный способ может быть использован для вставки единственной мутации в комплекс трубок вируса для улучшения репликации вируса. Данный способ также может быть использован для конструирования антимикробных пептидов; пиоцинов; ЭПС-деполимераз; белков, ингибирующих CRISPR/Cas; хвостовых волокон из бактериофага; репортерных генов (то есть *Lux*, *GFP*); генов для подавления кворума; нуклеаз; нуклеаз TALEN; белков системы CRISPR типа I, типа II, типа III, типа IV, типа V и типа VI (т.е. Cas9); CRISPR РНК, факторов транскрипции и иммуномодулирующих факторов человека в бактериофаге для улучшения активности бактериофага в бактериофаговой терапии или связанных с ним применениях. Данные элементы могут быть функционально связаны с нативными или гетерологичными регуляторными элементами, такими как нативный промотор, гетерологичный промотор, индуцируемый промотор или любой их комбинацией.

[0206] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к сконструированному вирусу, содержащему сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту, способную при введении в клетку-хозяина продуцировать вирусные частицы, не встречающиеся в природе, с двумя или более улучшенными вирусными свойствами по сравнению с несконструированной вирусной нуклеиновой кислотой. В некоторых аспектах полученные вирусные частицы имеют по меньшей мере три улучшенных вирусных свойства. В некоторых

аспектах каждое улучшенное вирусное свойство выбрано из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунного надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотикочувствительности бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[0207] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к сконструированному вирусу, содержащему сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых аспектах сконструированная вирусная нуклеиновая кислота представляет собой сконструированный вирусный геном. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном представляет собой сконструированный геном бактериофага. В некоторых аспектах у сконструированного бактериофага по меньшей мере одним из улучшенных вирусных свойств является круг хозяев.

[0208] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает сконструированный вирус с двумя или более улучшенными вирусными свойствами, который содержит сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых аспектах каждое улучшенное вирусное свойство является результатом, по меньшей мере одной модификации в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте. В некоторых аспектах по меньшей мере одно улучшенное вирусное свойство является результатом по меньшей мере двух модификаций в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте. В некоторых аспектах модификации, содержащиеся в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте, являются результатом одного этапа конструирования. В некоторых аспектах модификации, содержащиеся в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте, являются результатом неоднократно повторяемых этапов конструирования.

[0209] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает сконструированный вирус с двумя или более улучшенными вирусными свойствами, который содержит сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту.

[0210] В некоторых аспектах по меньшей мере одна из модификаций находится в последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, содержащейся в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 25.

[0211] В некоторых аспектах по меньшей мере одна из модификаций находится в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 49.

[0212] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит все или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит весь или часть гетерологичного гена *gp18*. В некоторых аспектах гетерологичный ген *gp18* имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 26. В некоторых аспектах гетерологичный ген *gp18* кодирует аминокислотную последовательность с по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полной идентичностью с SEQ ID NO: 38.

[0213] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном

содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит весь или часть сконструированного гена *gp34*. В некоторых аспектах сконструированный ген *gp34* кодирует аминокислотную последовательность, содержащую мутацию в положении, соответствующем положению 55 аминокислоты SEQ ID NO: 5. В некоторых аспектах гетерологичный ген *gp34* имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 4.

[0214] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в одной или более последовательностях, имеющих по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 50.

[0215] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в каждой последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 1,

последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 2, последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 3 и последовательности, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 50. В некоторых аспектах модификации включают замену G на A в положении, соответствующем положению 50 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, замену G на T в положении, соответствующем положению 160 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 50, замену A на G в положении, соответствующем положению 245 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2, замену AT на TC в положениях, соответствующих положениям нуклеиновой кислоты 247-248 SEQ ID NO: 2 и замену A на G в положении, соответствующем положению 757 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3.

[0216] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в одной или более последовательностях нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36

и SEQ ID NO: 48.

[0217] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит модификацию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей каждую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 34, аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 35, аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 36, и аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 48. В некоторых аспектах модификации включают замену С на Y в положении, соответствующем аминокислотному положению 17 SEQ ID NO: 34, замену D на Y в положении, соответствующем аминокислотному положению 36 SEQ ID NO: 48, замену D на G в положении, соответствующем аминокислотной позиции 82 SEQ ID NO: 35, замену I на S в положении, соответствующем аминокислотному положению 83 SEQ ID NO: 35, и замену N на D в положении, соответствующем аминокислотному положению 253 SEQ ID NO: 36.

[0218] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с геномом LUZ19. В некоторых аспектах

сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 25. В некоторых аспектах модификация представляет собой введение молекулы гетерологичной нуклеиновой кислоты в последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 25 или замену последовательности, содержащейся в последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 25 с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, и SEQ ID NO: 20.

[0219] В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном содержит весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с геномом LUZ19. В некоторых аспектах сконструированный вирусный геном дополнительно содержит модификацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по

меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 49. В некоторых аспектах модификация представляет собой введение гетероличной молекулы нуклеиновой кислоты в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 49 или замену последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 49 с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

[0220] В некоторых аспектах сконструированная вирусная нуклеиновая кислота содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, функционально связанную с промотором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, содержащуюся в SEQ ID NO: 21 или ее часть.

[0221] В некоторых аспектах сконструированная вирусная нуклеиновая кислота содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, функционально связанную с терминатором,

содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, содержащуюся в SEQ ID NO: 22, или ее часть.

[0222] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает способ получения сконструированного вируса, представляющего интерес, обладающего двумя или более необходимыми вирусными свойствами, включающий: (a) обеспечение первого вирусного генома; и (b) конструирование второго вирусного генома путем объединения по меньшей мере одного фрагмента первого вирусного генома с по меньшей мере одной молекулой восстанавливающей нуклеиновой кислоты, так что полученный второй вирусный геном содержит по меньшей мере одну модификацию по сравнению с первым вирусным геномом и при этом при введении в клетку-хозяина второй вирусный геном способен продуцировать вирусные частицы с двумя или более улучшенными вирусными свойствами. В некоторых аспектах способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает (c) повторение этапов (a) – (b) в одном или более циклах. В некоторых аспектах каждое улучшенное вирусное свойство выбрано из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунного надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотиокочувствительности бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[0223] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает способ получения сконструированного вируса, представляющего интерес, обладающего двумя или более необходимыми вирусными свойствами, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах конструирование второго вирусного генома на стадии (b) дополнительно включает: (1) расщепление *in vitro* области первого вирусного генома с использованием эндонуклеазы; и (2) сборку по меньшей мере одного фрагмента расщепленного первого вирусного генома с по меньшей мере одной молекулой восстанавливающей нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах первый

вирусный геном выделяется из вирусных частиц. В некоторых аспектах первый вирусный геном или по меньшей мере одну восстанавливающую молекулу нуклеиновой кислоты синтезируют *de novo*. В некоторых аспектах синтез *de novo* включает объединение химически синтезированных молекул нуклеиновой кислоты, последовательностей нуклеиновой кислоты с амплифицированной ПЦР, расщепленных фрагментов выделенных молекул нуклеиновой кислоты или любой их комбинации. В некоторых аспектах первый вирусный геном или по меньшей мере одну восстанавливающую молекулу нуклеиновой кислоты амплифицируют перед расщеплением *in vitro*.

[0224] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает способ получения сконструированного вируса, представляющего интерес, обладающего двумя или более желательными вирусными свойствами, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах первый вирусный геном составляет по меньшей мере 18 т.п.н. В некоторых аспектах первый вирусный геном составляет от по меньшей мере 2 т.п.н. до по меньшей мере 4 млн п.н. В некоторых аспектах первый вирусный геном составляет от по меньшей мере 18 т.п.н. до по меньшей мере 4 млн п.н. В некоторых аспектах первый вирусный геном составляет по меньшей мере 5 т.п.н., по меньшей мере 10 т.п.н., по меньшей мере 15 т.п.н., по меньшей мере 18 т.п.н., по меньшей мере 20 т.п.н., по меньшей мере 25 т.п.н., по меньшей мере 30 т.п.н., по меньшей мере 35 т.п.н., по меньшей мере 40 т.п.н., по меньшей мере 45 т.п.н., по меньшей мере 50 т.п.н., по меньшей мере 55 т.п.н., по меньшей мере 60 т.п.н., по меньшей мере 65 т.п.н., по меньшей мере 70 т.п.н., по меньшей мере 75 т.п.н., по меньшей мере 80 т.п.н., по меньшей мере 85 т.п.н., по меньшей мере 90 т.п.н., по меньшей мере 100 т.п.н., по по меньшей мере 125 т.п.н., по меньшей мере 150 т.п.н., по меньшей мере 175 т.п.н., по меньшей мере 200 т.п.н., по меньшей мере 250 т.п.н., по меньшей мере 300 т.п.н., по меньшей мере 400 т.п.н., по меньшей мере 500 т.п.н., по меньшей мере 600 т.п.н., по меньшей мере 700 т.п.н., по меньшей мере 800 т.п.н., по меньшей мере 900 т.п.н., по меньшей мере 1 млн п.н., по меньшей мере 1,5 млн п.н., по меньшей мере 2 млн п.н., по меньшей мере 2,5 млн п.н., по

меньшей мере 3 млн п.н. или по меньшей мере 3,5 млн п.н.

[0225] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает способ получения сконструированного вируса, представляющего интерес, обладающего двумя или более желательными вирусными свойствами, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах сборку выполняют *in vitro* или *in vivo*. В некоторых аспектах сборку выполняют *in vitro* при помощи смеси, содержащей: (a) выделенную нетермостабильную 5'-3'-экзонуклеазу, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; (b) краудинг-агент; (c) выделенную термостабильную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-экзонуклеазной активностью или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; (d) выделенную термостабильную лигазу; (e) смесь дНТФ; и (f) подходящий буфер в условиях, эффективных для вставки фрагмента в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту с образованием рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей сконструированный вирусный геном.

[0226] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает способ получения сконструированного вируса, представляющего интерес, обладающего двумя или более желательными вирусными свойствами, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах сборку выполняют *in vitro* или *in vivo*. В некоторых аспектах сборку выполняют *in vivo* в клетке-хозяина.

[0227] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает способ получения сконструированного вируса, представляющего интерес, обладающего двумя или более желательными вирусными свойствами, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах эндонуклеаза представляет собой РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых аспектах способ дополнительно включает одну или две направляющие РНК. В некоторых аспектах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9. В некоторых аспектах направляющие РНК включают 1) химерную гРНК или 2) crРНК и tracrРНК.

[0228] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает способ получения сконструированного вируса,

представляющего интерес, обладающего двумя или более желательными вирусными свойствами, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах эндонуклеазу инактивируют нагреванием или удаляют. В некоторых аспектах система расщепления *in vitro* дополнительно содержит спермидин.

[0229] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает способ получения сконструированного вируса, представляющего интерес, обладающего двумя или более желательными вирусными свойствами, описанными в настоящем документе. В некоторых аспектах способ дополнительно включает трансформацию сконструированного вирусного генома в клетку-хозяина. В некоторых аспектах способ дополнительно включает использование упаковочного набора *in vitro* для упаковки сконструированного вирусного генома в вирусные частицы.

[0230] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает сконструированный вирус, полученный любым из способов, описанных в настоящем документе.

[0231] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает композиции любого из сконструированных вирусов, описанных в настоящем документе, получаемых любым из способов конструирования, описанных в настоящем документе.

[0232] В некоторых вариантах реализации настоящее раскрытие обеспечивает набор для конструирования молекул вирусной нуклеиновой кислоты, включающий очищенную рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу; выделенную нетермостабильную 5'-3'-экзонуклеазу, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; краудинг-агент; выделенную термостабильную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-экзонуклеазной активностью или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; выделенную термостабильную лигазу; смесь дНТФ; и подходящий буфер. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит специально разработанные гидовые РНК. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит специально разработанные синтезированные молекулы нуклеиновой кислоты, предназначенные для использования в качестве вставленного

фрагмента ДНК в реакции сборки. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит компетентные клетки-хозяева для трансформации. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит выделенные вирусные геномные нуклеиновые кислоты.

[0233] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает систему сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты *in vitro*, содержащую: выделенную вирусную нуклеиновую кислоту, нуклеазу, рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу, по меньшей мере одну нацеливающую РНК и фрагмент нуклеиновой кислоты, который должен быть вставлен в сайт расщепления выделенной нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах система такова, что рекомбинантная РНК-направляемая нуклеаза и по меньшей мере одна нацеливающая РНК образуют комплекс, способный расщеплять выделенную вирусную нуклеиновую кислоту. В некоторых примерах система дополнительно содержит спермидин. В некоторых примерах система дополнительно содержит: выделенную нетермостабильную 5'-3'-экзонуклеазу, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; краудинг-агент; выделенную термостабильную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-экзонуклеазной активностью или смесью указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью; выделенную термостабильную лигазу; смесь дНТФ; и подходящий буфер, в котором система находится в условиях, эффективных для вставки фрагмента нуклеиновой кислоты в выделенную вирусную нуклеиновую кислоту в месте расщепления РНК-направляемой нуклеазы с образованием рекомбинантной вирусной нуклеиновой кислоты.

[0234] В некоторых аспектах система, описанная в настоящем документе, такова, что рекомбинантная вирусная нуклеиновая кислота способна продуцировать вирусные частицы, не встречающиеся в природе, по меньшей мере с одним улучшенным вирусным свойством по сравнению с несконструированной вирусной нуклеиновой кислотой. В некоторых примерах улучшенное вирусное свойство выбирают из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунного надзора, иммунной

стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагам, антибиотикочувствительности бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[0235] В некоторых аспектах в системе, описанной в данном документе, РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9. В некоторых примерах РНК-направляемую нуклеазу инактивируют или удаляют после расщепления.

[0236] В некоторых аспектах способ, описанный в настоящем документе, используют в качестве способа коррекции ошибок для коррекции последовательностей в выделенных нуклеиновых кислотах. Стандартные методы коррекции ошибок основаны на ПЦР, имеют две неотъемлемые проблемы: 1) ПЦР может вводить дополнительные нежелательные мутации в нуклеиновую кислоту и 2) ПЦР в этом контексте имеет ограничение по размеру приблизительно 5 т.п.н. Поэтому стандартные методы коррекции ошибок на основе ПЦР не могут быть надежно выполнены на плазидах размером более 5 т.п.н., либо в результате мутаций, вызванных ПЦР, либо в случае невозможности усиления. Описанный в настоящем документе способ конструирования *in vitro* последовательности нуклеиновой кислоты обходит необходимость ПЦР-амплификации, которая устраняет ограничение по размеру и исключает возможность возникновения мутаций, вызванных ПЦР.

[0237] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* последовательности нуклеиновой кислоты, включающей выделение нуклеиновой кислоты; расщепление *in vitro* области нуклеиновой кислоты с использованием РНК-направляемой нуклеазы; и сборку рекомбинантной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента ДНК или РНК в расщепленную нуклеиновую кислоту. В одном аспекте расщепление *in vitro* представляет собой ферментативное расщепление, основанное на РНК. В другом аспекте ферментативное расщепление проводят с использованием Cas9 или фермента, полученного из Cas9. В дополнительном аспекте расщепление дополнительно включает нацеливающие РНК. В другом аспекте система расщепления дополнительно содержит спермидин. В

конкретном аспекте нацеливающие РНК представляют собой гРНК, crРНК и/или tracrРНК. В дополнительном аспекте после расщепления, РНК-направляемую нуклеазу инактивируют стандартными методами, таким как воздействием тепла, например, такими как по меньшей мере 80° Цельсия. Дополнительно или альтернативно, РНК-направляемую нуклеазу удаляют стандартными способами, такими как, например, фенольно-хлороформной экстракцией.

[0238] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* последовательности нуклеиновой кислоты, включающий выделение нуклеиновой кислоты; расщепления *in vitro* области нуклеиновой кислоты с использованием РНК-направляемой нуклеазы; и сборку рекомбинантной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента ДНК или РНК в расщепленную нуклеиновую кислоту. В некоторых примерах сборку проводят *in vitro* в одном сосуде со смесью компонентов, включающих (a) выделенную нетермостабильную 5'-3'-эксонуклеазу, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью, (b) краудинг-агент, (c) выделенную термостабильную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-эксонуклеазной активностью или смесью указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью, (d) выделенную термостабильную лигазу, (e) смесь дНТФ и (f) подходящий буфер в условиях, эффективных для вставки фрагмента в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту с образованием рекомбинантной нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах эксонуклеаза представляет собой эксонуклеазу T5, и приведение в контакт происходит в изотермических условиях, и/или краудинг-агент представляет собой ПЭГ, и/или невытесняющая ДНК-полимераза представляет собой ДНК-полимеразу Phusion™ или ДНК-полимеразу VENT® и/или лигаза представляет собой Taq-лигазу. В некоторых примерах сборку *in vitro* выполняют при помощи одноступенчатой или изотермической сборки методом Gibson Assembly. В некоторых примерах сборку *in vitro* выполняют при помощи двухступенчатой сборки методом Gibson Assembly.

[0239] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* последовательности нуклеиновой

кислоты, содержащей РНК-направляемую нуклеазу. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 II типа. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9. В некоторых примерах РНК-направляемая нуклеаза представляет собой выделенный рекомбинантный фермент Cas9 или Cas9. В некоторых примерах существует по меньшей мере одна нацеливающая РНК. В некоторых примерах существует две нацеливающие РНК. В некоторых примерах нацеливающая РНК представляет собой химерную гидовую РНК (гРНК) или набор crРНК и tracrРНК. В некоторых примерах в реакции расщепления *in vitro* используют две гРНК. В некоторых примерах в реакции расщепления *in vitro* используют два набора crРНК и tracrРНК.

[0240] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* последовательности нуклеиновой кислоты, включающий этап расщепления *in vitro*. В некоторых примерах после расщепления, РНК-направляемую нуклеазу инактивируют стандартными методами, такими как воздействие теплом, таким как, например, по меньшей мере 80 ° Цельсия. В некоторых примерах, после расщепления, РНК-направляемую нуклеазу удаляют фенольно-хлороформной экстракцией. В некоторых примерах, после расщепления, РНК-направляемую нуклеазу удаляют другими способами экстракции, хорошо известными в данной области техники.

[0241] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* последовательности нуклеиновой кислоты, приводящей к образованию сконструированной нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах сконструированную нуклеиновую кислоту затем трансформируют в клетку-хозяин. В некоторых примерах клетка-хозяин представляет собой *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *V. natriegens*, *B. subtilis* или другой микроорганизм, хорошо известный в данной области техники. В некоторых примерах трансформацию выполняют путем теплового шока, электропорации, биолистики, бомбардировки частиц, конъюгации, трансдукции, липофекции или другого известного метода, хорошо известного в данной области техники.

[0242] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту. В некоторых примерах нуклеиновая кислота представляет собой полный геном, выделенный из клетки-хозяина. В некоторых примерах клетка-хозяин представляет собой *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis*, *V. natriegens*, *P. aeruginosa* или другой известный микроорганизм. В некоторых примерах нуклеиновая кислота представляет собой плазмиду. В некоторых примерах плазмиду выделяют из клетки-хозяина. В некоторых примерах нуклеиновую кислоту, представляющую интерес, клонировали в плазмиду, трансформировали в клетку-хозяин и выделяли до конструирования по способу, описанному в настоящем документе.

[0243] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ конструирования *in vitro* последовательности нуклеиновой кислоты, включающей выделение нуклеиновой кислоты. В некоторых примерах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой геном или плазмиду. В некоторых примерах выделенный геном или плазида составляет по меньшей мере 6 т.п.н., по меньшей мере 7 т.п.н., по меньшей мере 8 т.п.н., по меньшей мере 9 т.п.н., по меньшей мере 10 т.п.н., по меньшей мере 12 т.п.н., по меньшей мере 15 т.п.н., по меньшей мере 20 т.п.н., по меньшей мере 25 т.п.н. или по меньшей мере 28 т.п.н. В некоторых примерах выделенный геном или плазида составляет от 6 т.п.н. до 1 млн п.н. В некоторых примерах выделенный геном или плазида составляет: от 6 т.п.н. до 10 т.п.н., от 8 т.п.н. до 15 т.п.н., от 12 т.п.н. до 20 т.п.н., от 15 т.п.н. до 22 т.п.н., от 20 т.п.н. до 25 т.п.н., от 22 т.п.н. до 28 т.п.н., от 25 т.п.н. до 30 т.п.н., от 25 т.п.н. до 50 т.п.н., или от 40 т.п.н. до 100 т.п.н.

[0244] Дополнительно или, альтернативно, к любому из вышеописанных вариантов реализации раскрытие включает следующие варианты реализации изобретения:

[0245] Вариант реализации изобретения 1 представляет собой сконструированный вирус, содержащий сконструированную вирусную нуклеиновую кислоту, способную при введении в клетку-хозяина

продуцировать не встречающиеся в природе вирусные частицы с двумя или более, или, возможно, тремя или более улучшенными вирусными свойствами по сравнению с вирусными частицами, продуцируемыми при введении сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина.

[0246] Вариант реализации изобретения 2 представляет собой сконструированный вирус согласно варианту реализации изобретения 1, при этом каждое улучшенное вирусное свойство выбрано из группы, состоящей из круга хозяев, вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунного надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагу, антибиотической сенсibilизации бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления и редактирования генома хозяина.

[0247] Вариант реализации изобретения 3 представляет собой сконструированный вирус согласно варианту реализации изобретения 1 или 2, причем вирусная нуклеиновая кислота представляет собой одну или более из следующих вирусных нуклеиновых кислот: вирусный геном, фрагмент вирусного генома, генома бактериофага, фрагмент генома бактериофага, геном литического бактериофага, фрагмент генома литического бактериофага, или любую их комбинацию.

[0248] Вариант реализации изобретения 4 представляет собой сконструированный вирус любого из вариантов реализации изобретения 1-3, причем сконструированная вирусная нуклеиновая кислота представляет собой геном бактериофага и необязательно, при этом по меньшей мере одно из улучшенных вирусных свойств представляет собой круг хозяев.

[0249] Вариант реализации изобретения 5 представляет собой сконструированный вирус любого из вариантов реализации изобретения 1-4, причем выполняется по меньшей мере одно из следующего: 1) каждое улучшенное вирусное свойство является результатом по меньшей мере одной модификации в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте; 2) по меньшей мере одно улучшенное вирусное свойство является результатом по меньшей мере двух модификаций в

сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте; 3) модификации, содержащиеся в вирусной нуклеиновой кислоте, являются результатом одного этапа конструирования, 4) модификации, содержащиеся в сконструированной вирусной нуклеиновой кислоте, являются результатом итерации этапов конструирования или 5) любой их комбинации.

[0250] Вариант реализации изобретения 6 представляет собой сконструированный вирус любого из вариантов реализации изобретения 1-5, в котором по меньшей мере одна из модификаций находится внутри:

1) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, содержащейся в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 25, или

2) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 49, или

3) любой их комбинации.

[0251] Вариант реализации изобретения 7 представляет собой сконструированный вирус согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-6, причем сконструированная вирусная нуклеиновая кислота содержит сконструированный вирусный геном, содержащий весь или часть вирусного генома, имеющего по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с геномом LUZ19.

[0252] Вариант реализации изобретения 8 представляет собой

сконструированный вирус любого из вариантов реализации изобретения 1-7, причем сконструированный вирусный геном дополнительно содержит по меньшей мере одно из следующего:

1) весь или часть гетерологичного гена *gpl8* и, необязательно, в котором гетерологичный ген *gpl8* имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 26;

2) весь или часть гетерологичного гена *gpl8* и, необязательно, в котором гетерологичный ген *gpl8* кодирует аминокислотную последовательность с по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полной идентичностью с SEQ ID NO: 38;

3) весь или часть сконструированного гена *gpr34* и, необязательно, в котором гетерологичный ген *gpr34* кодирует аминокислотную последовательность, содержащую мутацию в положении, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 5, или необязательно, в котором гетерологичный ген *gpr34* имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 4;

4) модификацию в одной или более последовательностях, имеющих по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 50,

и, необязательно, модификацию в каждой последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере

95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 1, последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность SEQ ID NO: 2, последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 3, и последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 50,

и, необязательно, в которой модификации включают замену G на A в положении, соответствующем положению 50 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, замену G на T в положении, соответствующем положению 160 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 50, замену A на G в положении, соответствующем положению 245 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2, замену AT на TC в положениях, соответствующих положениям нуклеиновой кислоты 247-248 SEQ ID NO: 2 и замену A на G в положении, соответствующем положению 757 нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3;

5) модификацию в одной или более последовательностях нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 48,

и, необязательно, модификацию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей каждую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере

80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 34, аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 35, аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 36 и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 48,

и, необязательно, в которой модификации включают замену С на У в положении, соответствующем аминокислотному положению 17 SEQ ID NO: 34, замену D на У в положении, соответствующем аминокислотному положению 36 SEQ ID NO: 48, D на G в положении, соответствующем аминокислотному положению 82 SEQ ID NO: 35, замену I на S в положении, соответствующем аминокислотному положению 83 SEQ ID NO: 35, и замену N на D в положении, соответствующем аминокислотному положению 253 SEQ ID NO: 36;

6) модификацию в последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 25,

и, необязательно, в которой модификация представляет собой введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты в последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 25 или замену последовательности, содержащейся в

последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 25 с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты,

и, необязательно, в которой гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, и SEQ ID NO: 20;

7) модификацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 49 и,

необязательно, в которой модификация представляет собой введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 49 или заменой последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с SEQ ID NO: 49 с гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты,

и, необязательно, в которой гетерологичная молекула

нуклеиновой кислоты содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, 100% или полную идентичность с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47, 8) любую их комбинацию.

[0253] Вариант реализации изобретения 9 представляет собой сконструированный вирус по любому из вариантов реализации изобретения 1-8, причем сконструированная вирусная нуклеиновая кислота содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, функционально связанную с 1) промотором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, содержащуюся в SEQ ID NO: 21, или ее часть, 2) терминатором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, содержащуюся в SEQ ID NO: 22, или ее часть, или 3) любую их комбинацию.

[0254] Вариант реализации изобретения 10 представляет собой способ получения сконструированного вируса, имеющего два или более желательных вирусных свойства, включающий: (a) обеспечение первого вирусного генома; и (b) создание сконструированного вирусного генома путем объединения по меньшей мере одного фрагмента первого вирусного генома с по меньшей мере одной молекулой восстанавливающей нуклеиновой кислоты для получения второго вирусного генома, содержащего по меньшей мере одну модификацию по сравнению с первым вирусным геномом; при этом второй вирусный геном, будучи введенным в клетку-хозяин, способен продуцировать вирусные частицы с двумя или более улучшенными вирусными свойствами и необязательно (c) повторять этапы (a) - (b) в одной или более итерациях.

[0255] Вариант реализации изобретения 11 представляет собой вариант реализации изобретения 10, в котором каждое улучшенное вирусное свойство выбрано из группы, состоящей из круга хозяев,

вирусного литического цикла, адсорбции, прикрепления, инъекции, репликации и сборки, лизиса, величины выхода фага, ускользания от иммунного надзора, иммунной стимуляции, иммунной дезактивации, дисперсии биопленки, устойчивости бактерий к фагу, антибиотической сенсibilизации бактерий, модуляции факторов вирулентности и направленного расщепления или редактирования генома хозяина.

[0256] Вариант реализации изобретения 12 представляет собой способ согласно варианту реализации изобретения 10 или 11, в котором создание сконструированного вирусного генома на стадии (b) включает: (1) расщепление *in vitro* области первого вирусного генома с использованием эндонуклеазы; и (2) сборку по меньшей мере одного фрагмента расщепленного первого вирусного генома по меньшей мере с одной молекулой восстанавливающей нуклеиновой кислоты.

[0257] Вариант реализации изобретения 13 представляет собой способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-12, в котором выполняется по меньшей мере один из следующих элементов: 1) первый вирусный геном выделяют из вирусных частиц, 2) первую вирусную и/или по меньшей мере одну восстанавливающую молекулу нуклеиновой кислоты синтезируют *de novo* и, необязательно, в котором синтез *de novo* включает объединение химически синтезированных молекул нуклеиновой кислоты, ПЦР-амплифицированных последовательностей нуклеиновых кислот, расщепленных фрагментов изолированных молекул нуклеиновой кислоты или любой их комбинации, 3) первый вирусный геном и/или по меньшей мере одну восстанавливающую молекулу нуклеиновой кислоты амплифицируют перед расщеплением *in vitro* или 4) любую их комбинацию.

[0258] Вариант реализации изобретения 14 представляет собой способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-13, причем первый вирусный геном составляет по меньшей мере одно из следующего:

1) по меньшей мере 3 т.п.н., по меньшей мере 10 т.п.н., по меньшей мере 18 т.п.н., по меньшей мере 25 т.п.н. или по меньшей мере 30 т.п.н.;

2) по меньшей мере 18 т.п.н.;

3) от по меньшей мере 2 т.п.н. до по меньшей мере 4 млн п.н.;

4) от по меньшей мере 18 т.п.н. до по меньшей мере 4 млн п.н.;

или

5) по меньшей мере 5 т.п.н., по меньшей мере, 10 т.п.н., по меньшей мере 15 т.п.н., по меньшей мере 18 т.п.н., по меньшей мере 20 т.п.н., по меньшей мере 25 т.п.н., по меньшей мере 30 т.п.н., по меньшей мере 35 т.п.н., по меньшей мере 40 т.п.н., по меньшей мере 45 т.п.н., по меньшей мере 50 т.п.н., по меньшей мере 55 т.п.н., по меньшей мере 60 т.п.н., по меньшей мере 65 т.п.н., по меньшей мере 70 т.п.н., по меньшей мере 75 т.п.н., по меньшей мере 80 т.п.н., по меньшей мере 85 т.п.н., по меньшей мере 90 т.п.н., по меньшей мере 100 т.п.н., по меньшей мере 125 т.п.н., по меньшей мере 150 т.п.н., по меньшей мере 175 т.п.н., по меньшей мере 200 т.п.н., по меньшей мере 250 т.п.н., по меньшей мере 300 т.п.н., по меньшей мере 400 т.п.н., по меньшей мере 500 т.п.н., по меньшей мере 600 т.п.н., по меньшей мере 700 т.п.н., по меньшей мере 800 т.п.н., по меньшей мере 900 т.п.н., по меньшей мере 1 млн п.н., по меньшей мере 1,5 млн п.н., по меньшей мере 2 млн п.н., по меньшей мере 2,5 млн п.н., по меньшей мере 3 млн п.н. или по меньшей мере 3,5 млн п.н.

[0259] Вариант реализации 15 представляет собой способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-14, в котором сборку выполняют *in vitro* и, необязательно, в котором сборку выполняют *in vitro* с помощью смеси, содержащей: (a) выделенную 5'-3'-эксонуклеазу, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью, которая необязательно не термостабильна; (b) необязательно краудинг-агент; (c) выделенную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-эксонуклеазной активностью, которая, необязательно, является термостабильной, или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью; (d) выделенную лигазу, которая, необязательно, является термостабильной; (e) смесь дНТФ; и (f) необязательно подходящий буфер в условиях, эффективных для вставки фрагмента в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту с образованием рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей

сконструированный вирусный геном.

[0260] Вариант реализации изобретения 16 представляет собой способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-14, в котором сборку выполняют *in vivo* и, необязательно, в которой сборку *in vivo* выполняют в клетке-хозяине.

[0261] Вариант реализации изобретения 17 представляет собой способ согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-16, в котором выполняется по меньшей мере один из следующих элементов: 1) эндонуклеаза представляет собой РНК-направляемую нуклеазу 2) способ дополнительно включает по меньшей мере одну направляющую РНК, 3) РНК-направляемая нуклеаза представляет собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9, и при этом по меньшей мере одна направляющая РНК содержит (а) химерную гРНК или (б) crРНК и tracrРНК, 4) эндонуклеазу подвергают инаktivации теплом или удалению перед сборкой, 5) система расщепления *in vitro* дополнительно содержит спермидин, 6) способ дополнительно включает трансформацию сконструированного вирусного генома в клетку-хозяина, 7) способ дополнительно включает использование упаковочного набора *in vitro* для упаковки сконструированного вирусного генома в вирусные частицы или 8) любую их комбинацию.

[0262] Вариант реализации изобретения 18 представляет собой модифицированный вирус, полученный способом согласно любому из вариантов реализации изобретения 10-17, и необязательно, в котором сконструированный вирус представляет собой сконструированные вирусы согласно любому из вариантов реализации изобретения 1-9.

[0263] Вариант реализации изобретения 19 представляет собой набор для сконструированных молекул нуклеиновых кислот, которые являются необязательно молекулами вирусной нуклеиновой кислоты, которые включают: (а) очищенную рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу; (б) выделенную 5'-3'-экзонуклеазу, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью, которая необязательно нетермостабильна; (с) выделенную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-экзонуклеазной активностью, которая необязательно является термостабильной, или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью;

(d) выделенную лигазу, которая необязательно является термостабильной; и необязательно дополнительно включает любое из следующего: 1) краудинг-агент, 2) смесь дНТФ, 3) подходящий буфер, 4) специально разработанные направляющие РНК, 5) специально разработанные синтезированные молекулы нуклеиновой кислоты, предназначенные для использования в качестве вставленного фрагмента ДНК в реакции сборки, 6) компетентные клетки-хозяева для трансформации, 7) выделенную вирусную геномную нуклеиновую кислоту или 8) любую их комбинацию.

[0264] Вариант реализации изобретения 20 представляет собой способ модификации последовательности нуклеиновой кислоты, включающий: (a) предоставление нуклеиновой кислоты; (b) расщепление *in vitro* области нуклеиновой кислоты с использованием РНК-направляемой нуклеазы; и (c) сборку рекомбинантной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента ДНК в расщепленную нуклеиновую кислоту, причем сборку проводят *in vitro* в одном сосуде со смесью компонентов, включающих: (i) выделенную 5'-3'-эксонуклеазу, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью, которая необязательно не термостабильна; (ii) выделенную невытесняющую ДНК-полимеразу с 3'-эксонуклеазной активностью, которая необязательно является термостабильной, или смесь указанной ДНК-полимеразы со второй ДНК-полимеразой, которая не обладает 3'-эксонуклеазной активностью; (iii) изолированную лигазу, которая необязательно является термостабильной; (iv) смесь дНТФ в условиях, которые являются эффективными для вставки фрагмента в расщепленную нуклеиновую кислоту с образованием рекомбинантной нуклеиновой кислоты и, необязательно, в которой сборка *in vitro* дополнительно содержит (v) краудинг-агент или (vi) подходящий буфер.

[0265] Вариант реализации изобретения 21 представляет собой способ согласно варианту реализации изобретения 20, в котором по меньшей мере выполняется один из следующих элементов: 1) РНК-направляемая нуклеаза представляе собой Cas9 или фермент, полученный из Cas9, 2) РНК-направляемая нуклеаза подвергается инактивации теплом или удалению перед сборкой, 3) способ

дополнительно включает трансформацию рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, 4) нуклеиновая кислота представляет собой плазмиду, выделенную из клетки-хозяина, и необязательно, при этом плазида составляет по меньшей мере 6 т.п.н., по меньшей мере 10 т.п.н., по меньшей мере 15 т.п.н. или по меньшей мере 20 т.п.н. или 5) любую их комбинацию.

[0266] Раскрытие во всех его аспектах проиллюстрировано дополнительно в следующих примерах. Однако примеры не ограничивают объем настоящего раскрытия, который определен прилагаемой формулой изобретения. Обсуждение общих способов, приведенных в настоящем документе, предназначено только для иллюстративных целей. Другие альтернативные способы и варианты реализации настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники после рассмотрения настоящего описания и должны быть включены в сущность и сферу действия настоящей заявки.

ПРИМЕРЫ

Пример I

Модификация вирусного генома *in vitro*

[0267] 43 т.п.н. дцДНК вирусного генома (номер доступа NC_010326.1) было выделено из вирусных частиц, например, с использованием набора для выделения ДНК фагов Norgen Biotek или любых других способов, известных специалистам в данной области техники (фиг. 2А). Сайт-специфическое расщепление выполняли с использованием РНК-направляемой нуклеазы Cas9 и транскрибируемых *in vitro* гРНК в двух независимых местах. Нерасщепленная геномная ДНК размером 43 т.п.н. мигрирует значительно меньше, чем самая большая маркерная полоса ДНК (10 т.п.н.). Расщепление линейного генома дает фрагменты трех размеров: ~ 39 т.п.н., ~ 4,3 т.п.н. и ~ 200 п.о. Нацеливающие гРНК использовали в избытке и блокировали фрагмент в 200 п.о. (фиг. 2Б). Фрагмент *gp7* из ФКФ77 был ПЦР-амплифицирован (фиг. 2В) с использованием праймеров, содержащих 5'-хвосты с гомологией 100 п.о. к областям, непосредственно расположенным в прямом и обратном направлении от сайтов расщепления LUZ19. Метод сборки Gibson Assembly был использован для бесшовной вставки ПЦР-амплифицированного фрагмента *gp7* ФКФ77

(SEQ ID NO: 8) в расщепленный геном LUZ19 для замены нативной области *gp7* (SEQ ID NO: 23) (фиг. 2Г). Наблюдали небольшой фон, так как Cas9-расщепление приводит к двухцепочечному разрыву ДНК с тупыми концами, который не имеет гомологии, необходимой для сборки методом Gibson Assembly *in vitro*. Отредатированные *in vitro* геномы трансформировали непосредственно в клетки-хозяева, чтобы получить функциональные вирусные частицы (фиг. 2Д). Вставку фрагмента гена ФKF77 в восстановленные вирусы проверяли с использованием ПЦР с праймерами, внутренними и внешними по отношению к области модификации. Неотредактированную геномную ДНК LUZ19 использовали как отрицательный контроль, тогда как все экспериментальные вирусы содержали новый фрагмент гена ФKF77 (последние 7 полос).

[0268] Эти данные представляют собой пример применения *in vitro* вирусной инженерии для редактирования генома литического фага *P. aeruginosa*. Сконструированный фаг, такой как LUZ19, не может быть получен стандартными методами из-за эффектов токсичности в гетерологичных бактериальных хозяевах, таких как *E. coli*, отсутствия селективных маркеров, подходящих для вирулентных вирусов, и отсутствия уникальных сайтов для стандартных ферментов рестрикции в геноме LUZ19. Поэтому эти данные демонстрируют, как описанный в настоящем документе, способ модификации *in vitro* позволяет осуществлять прямое и быстрое конструирование других генетически несовместимых вирусных геномов.

[0269] Для трансформаций в *P. aeruginosa* были получены химически компетентные клетки *P. aeruginosa*, как описано в Irani and Rowe (Irani, V.R. & Rowe, J. J. *BioTechniques* 1997, **22**, 54-56). По существу, 3 мл стартовой культуры клеток *P. aeruginosa* разбавляли в 400 мл свежей LB (среда Лурия-Бертани). Культуру выращивали при 37 °C при встряхивании (220 об/мин) до ОП₆₀₀=0,6, если не указано иное. Клетки охлаждали в течение 10 мин на льду, переносили в 500 мл колбу для центрифугирования и осаждали в центрифуге с охлаждением (4 °C) при 5000 g в течение 20 мин. Бактериальный осадок промывали 100 мл ледяного 150 ммоль/л MgCl₂ перед разделением на две 50 мл конические пробирки и осаждали при

5000 g в центрифуге с охлаждением (4 °C). Клетки промывали еще один раз с использованием 30 мл 150 ммоль/л MgCl₂ перед центрифугированием и ресуспендировали в 15 мл холодного 150 ммоль/л MgCl₂. Клеточную суспензию инкубировали на льду в течение 1 часа перед центрифугированием при 4 °C и ресуспендировали в 4 мл охлажденного 150 ммоль/л MgCl₂. Аликвоты в 200 мкл помещали в отдельные 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и выдерживали на льду в течение 2 сут. Очищенную ДНК добавляли к каждой аликвоте клеток, кратковременно встряхивали и инкубировали на льду еще 1 час. Клетки подвергали тепловому шоку при 50 °C в течение 3 мин и помещали непосредственно на лед в течение 5 мин до культивирования. Каждую трансформацию добавляли к 4 мл 50 °C агара для верхнего слоя LB и помещали на предварительно нагретую чашку Петри с LB. Чашки Петри переворачивали и инкубировали при 37 °C, чтобы обеспечить образование бактерий.

Пример II

Сконструированный вирус с расширенным кругом хозяев

[0270] Большая клиническая библиотека (282 штамма *P. aeruginosa*) была подвергнута скринингу на предмет чувствительности к фагам LUZ19 и LKD16 с использованием анализа бляшкообразования в двойном агаровом слое. Шестьдесят шесть штаммов были инфицированы хотя бы одним из двух вирусов, причем 18 и 6 штаммов были инфицированы исключительно LUZ19 и LKD16, соответственно. Таким образом, LUZ19 был выбран в качестве шасси для тестирования генетических элементов LKD16, ответственных за расширение круга хозяев. Сравнительная геномика между двумя вирусами показала, что продукт гена 18 LKD16 (*gp18*) имел отличную последовательность от гомолога *gp18* LUZ19, указывая на то, что он может отвечать за определение круга хозяев. Вирусный геном был выделен из вирусных частиц LUZ19, как описано выше. Сайтспецифическое расщепление проводили с использованием РНК-зависимой нуклеазы и транскрибируемых *in vitro* гРНК для экспрессии гена *gp18* LUG19. *Gp18* из LKD16 был амплифицирован ПЦР с гомологичными концами LUZ19 для интеграции. Метод сборки Gibson Assembly использовали для

бесшовной вставки ПЦР-амплифицированного *gp18* LKD16 (SEQ ID NO: 7) в расщепленный геном LUZ19, чтобы заменить нативную последовательность *gp18* (SEQ ID NO: 50). Сконструированные *in vitro* геномы трансформировали непосредственно в клетки-хозяева, чтобы получить функциональные вирусные частицы. Сконструированный вирус LUZ19, содержащий ген *gp18* LKD16, смог заразить все штаммы, обычно инфицированные фагом LUZ19, а также 3 штамма, ранее инфицированные только LKD16, демонстрируя расширение круга хозяев (фиг. 3Б и 6Б). Это демонстрирует, что *gp18* является генетическим элементом, ответственным за различающийся круг хозяев LKD16, и что сконструированный вирус LUZ19, несущий данный ген, лучше способен реплицировать в большем количестве штаммов хозяина.

[0271] Эти данные демонстрируют реализацию способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе, в отношении генетически неприемлемого вирусного генома, который приводит к улучшению вирусного свойства расширенного круга хозяев. Способность рационально модифицировать бактериофаг с расширенным кругом хозяев является большой ценностью при разработке вирусов для уничтожения бактерий.

Пример III

Сконструированный вирус с кругом хозяев рода вирусов

[0272] LUZ19 и/или производное LUZ19 использовали в качестве исходного материала для экспериментов по эволюции или коинфекции для определения целей для объединения круга хозяев рода вирусов ФКМВ в один репрезентативный вирус. Эксперименты по котрансформации или коинфекции выполняли либо в пермиссивном (РА01К), либо в непермиссивном (устойчивом) хозяине (РА7410 или РА7649) (фиг. 4А). Как коинфекцию, так и котрансформацию выполняли в присутствии LKD16 или ФКМВ, соответственно. Круг хозяев тестировали с применением анализа бляшкообразования в двойном агаровом слое на указанных бактериальных штаммах. После скрининга на расширенный круг хозяев в интересующем штамме, усовершенствованный фаг пассировали 3-5 раз альтернативно через пермиссивные и селективные штаммы (штамм, который инфицирован только LUZ19 – РА7632). Усовершенствованный фаг амплифицировали в

РАОІК, гДНК очищали и секвенировали. Сравнительную геномику между LUZ19 и усовершенствованным LUZ19, способным заражать штаммы, ранее чувствительные только к LKD16 или ФКМV, использовали для определения точечной мутации, ответственной за расширение круга хозяев (фиг. 4Б).

[0273] Большую клиническую библиотеку (282 штамма *P. aeruginosa*) подвергали скринингу на предмет восприимчивости к роду вирусов ФКМV с использованием анализа бляшкообразования в двойном агаровом слое. Три фага (LUZ19, LKD16 и ФКМV) отображали различающийся круг хозяев и были способны заразить 67 штаммов, при этом LUZ19 заразил большинство клинических штаммов (фиг. 4В). Шесть клинических штаммов (РА7245, РА7255, РА7427, РА7503, РА7686 и РА7410) восприимчивы только к LKD16, и один клинический штамм восприимчив только к ОКМV (РА7649). Таким образом, LUZ19 был выбран в качестве шасси для экспериментов по эволюции/коинфекции/котрансформации для получения варианта, который способен инфицировать все клинические штаммы, чувствительные к роду ФКМV. Сравнительной геномикой показано, что для того, чтобы LUZ19 заразил штаммы, восприимчивые только к LKD16 или ФКМV, необходимо было указать несколько точечных мутаций: (i) *gp13* C17Y (положение 50 SEQ ID NO: 1) необходимо для инфицирования РА7427; (ii) *gp18* D36Y (положение 106 SEQ ID NO: 50) необходимо для инфицирования РА7245, РА7503 и РА7686; *gp38* D82G и 183S (положение 245 и 247-248 SEQ ID NO: 2 соответственно) позволяет инфицировать РА7410 и РА7649; (iv) *gp40* N253D (положение 757 SEQ ID NO: 3) позволяет инфицировать РА7255 (фиг. 4В). Итеративное конструирование вышеупомянутых мутаций в шасси LUZ19 с использованием способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе, дало LUZ19 с широким кругом хозяев (ШКХ-LUZ19), способному заражать все клинические штаммы, восприимчивые к фактору рода ФКМВ (фиг. 4В).

[0274] Эти данные представляют собой пример использования способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе, для объединения круга хозяев рода вируса в один вирусный

геном путем первой идентификации генетических мутаций, ответственных за различия в круге хозяев после эволюционных экспериментов, скрининга, секвенирования, сравнительной геномики, и любой их комбинации.

Пример IV

Улучшенная вирусная репликация улучшает раннее разрушение биопленки

[0275] В другом примере вирусная эволюция и сравнительная геномика показали, что усовершенствованный фаг LUZ19 с мутацией L55 в пределах хвостового трубчатого белка В (Gp34) реплицируется с большей скоростью из-за увеличенного выхода фага (фиг. 5В). Чтобы подтвердить, что мутация Gp34 L55Δ улучшила вирусные свойства, вирусный геном LUZ19 выделяли из вирусных частиц. Сайт-специфическое расщепление выполняли с использованием РНК-зависимой нуклеазы и транскрибируемых *in vitro* гРНК для удаления гена *gp34* (SEQ ID NO: 4). Ген *gp34* L55Δ, который несет делецию кодона лейцина в аминокислотном положении 55 (Gp34 L55Δ, положение 163-165 SEQ ID NO:4), ПЦР-амплифицировали из усовершенствованного фага LUZ19. Метод сборки Gibson Assembly использовали для вставки ПЦР-амплифицированного гена *gp34* L55Δ в расщепленный геном LUZ19. Трансформированные *in vitro* геномы трансформировали непосредственно в клетки-хозяева, чтобы получить функциональные вирусные частицы. Сконструированный вирус LUZ19, содержащий Gp34 L55Δ, способен рассеять и лизировать бактерии. Анализ бляшкообразования в двойном агаровом слое использовали для того, чтобы показать, что у фага LUZ19, несущего мутацию *gp34* L55Δ5 (фаг*), была большая область очистки (прозрачное пятно), чем LUZ19 дикого типа. Были сделаны снимки и области очистки измеряли в течение двух суток (фиг. 5В). Расширяющийся диаметр лизиса указывает на то, что вирусы, несущие мутации Gp34 L55Δ, лучше способны рассеивать и лизировать бактерии. Анализом биопленки с окрашиванием кристаллическим фиолетовым измеряют накопление биопленки в виде измерения включения кристаллического фиолетового (фиг. 5В). Образцы, обработанные вирусами, содержащими мутации

gp34 L55Δ, имели значительное уменьшение биопленки по сравнению с вирусами с геном *gp34* дикого типа. На иллюстрации показано расположение мутации *gp34* (звездочка) по сравнению с геномом LUZ19 дикого типа (фиг. 5Г). Стандартные анализы, известные в данной области техники, должны были измерять адсорбцию вируса, латентный период и величину выхода фага как у дикого типа, так и мутантов *gp34* L55Δ. Эти данные указывают на то, что вирусы, содержащие мутацию *gp34* L55Δ, имели значительно увеличенный выход фага (фиг. 5Д).

[0276] Эти данные обеспечивают пример использования способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе, для создания вируса с улучшенными вирусными свойствами повышенного бактериального лизиса, выхода фага, репликации и раннего разрушения биопленки.

Пример V

Вирус, полученный путем итеративного конструирования, с ранним разрушением биопленки и расширенным кругом хозяев

[0277] Расширенный круг хозяев LUZ19_{LKD16gp18} рекомбинантного вирусного генома, созданный в примере II, был выделен из вирусных частиц. Для удаления *gp34* (SEQ ID NO: 4) с использованием РНК-зависимой нуклеазы и транскрибируемых *in vitro* гРНК выполняли сайтспецифическое расщепление. Мутацию *gp34* ΔLeu55, повышающую литическую активность, (положение 163-165 SEQ ID NO: 4), описанную в примере IV, затем ПЦР-амплифицировали и собирали в расщепленный вирусный геном LUZ19_{LKD16gp18} с применением метода сборки Gibson Assembly. Геномы, полученные путем итеративного конструирования *in vitro*, трансформировали непосредственно в клетки-хозяева для получения функциональных вирусных частиц, т. е. сконструированный вирус LUZ19, содержащий как ген *gp18* LKD16, так и мутацию *gp34* ΔLeu55 (LUZ19*_{LKD16gp18}).

[0278] Вирус LUZ19*_{LKD16gp18} анализировали на улучшенные вирусные свойства, используя анализы бляшкообразования в двойном агаровом слое, биопленки и анализы на прикрепление кератиноцитов человека *in vitro*. На фиг. 6Г показано, что у LUZ19*_{LKD16gp18} увеличен

круг хозяев. LUZ19*_{LKD16gp18} по сравнению с нативным LUZ19 для способности разрушать предварительно сформированные МЛР биопленки *P. aeruginosa*. В частности, LUZ19*_{LKD16gp18} и LUZ19 дикого типа инкубировали с биопленкой *P. aeruginosa*, и разрушение измеряли с использованием кристаллического фиолетового. На фиг. 6Д показано, что LUZ19*_{LKD16gp18} обладает повышенной способностью разрушать предварительно сформированные МЛР биопленки *P. aeruginosa* по сравнению с LUZ19 дикого типа. Вирус LUZ19*_{LKD16gp18} анализировали на эффективность фаговой терапии против бактерий, прикрепленных к кератиноцитам человека. В частности, *P. aeruginosa* прикрепляли к монослою клеток HaCaT. Затем клетки инкубировали с LUZ19*_{LKD16gp18} или LUZ19 дикого типа. Результаты показали, что фаг LUZ19*_{LKD16gp18} лучше способен устранять множественную лекарственную устойчивость (IVIDR.) Клетки *P. aeruginosa* прикрепляли к кератиноцитам человека (см. фиг. 6Е).

[0279] Эти данные приводят пример того, как способ конструирования *in vitro*, описанный в настоящем документе, использовали в системе для итеративного конструирования бактериофага с несколькими независимыми улучшенными вирусными свойствами, такими как расширенный круг хозяев и увеличенный выход фага. Важно отметить, что данные этапы конструирования не могут быть выполнены как напрямую, так и с использованием стандартных методов. Кроме того, эти данные демонстрируют, что способ конструирования *in vitro*, описанный в настоящем документе, использовали последовательно в итерационных циклах конструирования, что является важным свойством для применений в синтетической биологии.

Пример VI

Вирусы, полученные путем итеративного конструирования, с биофильм-диспергирующими полезными нагрузками и расширенным кругом хозяев, покрывающими полный вирусный род

[0280] Или экзополисахаридные (ЭПС) деполимеразы, или фенол-растворимые морфолины (PSM) клонировали в LUZ19 путем замены *gp49* (SEQ ID NO: 25) с использованием способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе, для определения их способности

диспергировать зрелую биопленку (фиг. 7). Чтобы сконструировать LUZ19 и WHR LUZ19 для экспрессии внеклеточной деполимеразы или поверхностно-активные полипептидов, *gp49* (SEQ ID NO: 25) LUZ19 или WHR LUZ19 удаляли путем расщепления с использованием РНК-зависимой нуклеазы, в этом случае Cas9 и *in vitro* транскрибируемые гРНК и затем заменяли на ген интереса (ГИ), фланкированный основным промотором капсида P_{gp32} (SEQ ID NO: 21) и терминатором T_{gp32} (SEQ ID NO: 22) с использованием метода сборки Gibson Assembly (фиг. 7А и 7В). В случае LUZ19 дикого типа, ГИ представляют собой ЭПС-деполимеразы (*Ppl5gp44* - хвостовой шип *gp44* из $\Phi 15$ *Pseudomonas pudita* (SEQ ID NO: 14); *NTUgp34* - хвостовой шип *gp34* из фага NTU *Klebsiella pneumoniae* (SEQ ID NO: 13); *LKA1gp49* - хвостовой шип *gp49* фага из LKA1 *P. aeruginosa* (SEQ ID NO: 12)), поверхностно-активные фенол-растворимые морфолины из *Staphylococcus epidermidis* (*PSMa*, SEQ ID NO: 18) и *Staphylococcus aureus* (*PSMa3* (SEQ ID NO: 16) и *PSMb2* (SEQ ID NO: 17)) и *DspB*-сурфактин из *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (SEQ ID NO: 15) (фиг. 7В). В случае ШКХ-LUZ19, ГИ представлял собой ЭПС-деполимеразу *Ppl5gp44* (SEQ ID NO: 14) и сурфактин *SePSMa* (SEQ ID NO: 18) (фиг. 7Г). Сконструированный фаг амплифицировали в соответствующей клетке-хозяина, выделяли и проверяли путем секвенирования.

[0281] Способность сконструированного фага к диспергированию зрелой биопленки была протестирована на 24-часовой биопленке, выращенной в устройстве МВЕС, с использованием 100 фагов на лунку в течение 3 часов. Вкратце, ночные культуры *P. aeruginosa* разбавляли (1: 100) в минимальной среде М63, дополненной сульфатом магния (1 мМ), глюкозой (0,2%) и казаминокислотами (0,5%), а затем добавляли в стерильные микротитрационные планшеты (150 мкл на лунку). Крышку с заглушками вставляли в планшет для микротитрования. После 24 ч инкубации при 37 °С крышку с заглушками перемещали на микротитрационный планшет, содержащий 160 мкл полной М63, содержащей 100 фагов на лунку. После 3 ч инкубации при 37 °С крышку с заглушками промывали 3 раза в воде, сушили и окрашивали 200 мкл 0,5% кристаллического фиолетового. Затем планшеты промывали водой для удаления несвязанного кристаллического

фиолетового и сушили. Краситель растворяли в 200 мкл 30% уксусной кислоты и измеряли оптическую плотность при ОП=550 нм.

[0282] DspB, который является поверхностно активным против биопленок *E. coli*, служил в качестве отрицательного контроля, поскольку он не имеет активности против *P. aeruginosa*. Две полезные нагрузки (Pp15gp44 и SePSMa) показали заметную активность против биопленки (фиг. 7Б). Примечательно, что PSM, которые являются сурфактинами с известной антибиопленочной активностью у грамположительных бактерий, никогда ранее не демонстрировали, что они диспергируют биопленку *P. aeruginosa*. Данные полезные нагрузки были сконструированы в ШКХ-LUZ19, чтобы определить, может ли фаг с широким кругом хозяев быть дополнительно модифицирован с целью придания ему способности диспергировать биопленку. Результаты показывают, что ШКХ-LUZ19, кодирующие Pp15gp44 или SePSMa, поддерживают их биофильм-диспергирующую активность (фиг. 7Г) и способность инфицировать все клинические штаммы, восприимчивые к роду вирусов O-KMV (фиг. 7Д, 7Е).

[0283] Эти данные представляют собой пример того, как способ конструирования *in vitro*, описанный в настоящем документе, может использоваться в системе для итеративного конструирования бактериофага с несколькими независимыми улучшенными вирусными свойствами, такими как неограничивающие свойства дисперсии биопленки и круг хозяев.

Пример VII

Сконструированные вирусы, экспрессирующие антибиотическую сенсibiliзирующую полезную нагрузку

[0284] С использованием способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе, LUZ19 был сконструирован для экспрессии лизинов из оцРНК-вирусов PRR1 и MS2. Лизины как из PRR1 (SEQ ID NO: 20), так из или MS2 (SEQ ID NO: 19) оцРНК-фага были встроены в локус *gp49* LUZ19 (SEQ ID NO: 25), фланкированный основным капсидным промотором Pgp32 (SEQ ID NO: 21) и терминатором Tgp32 (SEQ ID NO: 22), чтобы определить их способность ингибировать появление бактерий, устойчивых к фагу (фиг. 8А). Эти лизины ингибируют образование новых клеточных стенок путем связывания и

инактивации ферментов, важных для синтеза клеточной стенки, и предположительно сенсibiliзируют бактерии к другим антимикробным препаратам, особенно к нацеленным на клеточные стенки антибиотикам, таким как карбенициллин.

[0285] Конструкт получали, как описано выше, с использованием способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе. Сконструированный фаг амплифицировали в соответствующей клетке-хозяина, выделяли и проверяли путем секвенирования. Способность сконструированного фага ингибировать появление бактерий, устойчивых к фаговой терапии, в присутствии карбенициллина при $1/5$ х МИК тестировали в стандартном анализе зависимости «время – летальное действие» (фиг. 8Б, 8В). Результаты показывают, что сконструированные LUZ19, экспрессирующие лизины из оцРНК фага в сочетании с карбенициллином в субингибирующих концентрациях ($1/5$ х МИК) предотвращают повторный рост бактерий после фаговой терапии.

[0286] Эти данные представляют собой пример использования способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе, для создания вируса с улучшенными вирусными свойствами, в частности в данном случае, предотвращения развития устойчивости к фагу у бактерий.

Пример VIII

Сконструированный вирус, экспрессирующий видоспецифическую противомикробную белковую нагрузку

[0287] Используя способ конструирования *in vitro*, описанный в настоящем документе, LUZ19 был сконструирован для экспрессии антимикробного белка PyoS5, продуцируемого *P. aeruginosa*. Бактериоцин PyoS5 является видоспецифическим антимикробным белком, продуцируемым одним штаммом *P. aeruginosa*, чтобы препятствовать росту конкурирующих штаммов *P. aeruginosa*. ГДНК штамма PA01 *P. aeruginosa* использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации *pyoS5* (SEQ ID NO: 6) до клонирования в локус *gp49* LUZ19 (SEQ ID NO: 25), фланкированный основным промотором капсида P_{gp32} (SEQ ID NO: 21) и терминатором T_{gp32} (SEQ ID NO: 22) (фиг. 9А). PyoS5 связывается с широко диспергированным пиохелиновым рецептором FptA

перед конформационными изменениями для создания пор в мембране *P. aeruginosa*.

[0288] LUZ19+pyoS5 был создан, как описано выше, с использованием способа конструирования *in vitro*, описанный в настоящем документе. Сконструированный фаг амплифицировали внутри восприимчивого хозяина PA01, выделяли и проверяли путем секвенирования. Бактериальный штамм PA7416 выбирали для анализа, потому что лабораторный штамм PA01, как известно, устойчив к PyoS5, однако в анализе *in silico* показано, что штамм PA7416 МЛР *P. aeruginosa* был восприимчивым к фагу LUZ19 и кодировал PyoS5-рецептор FptA.

[0289] Способность фага ингибировать появление бактерий PA7416, устойчивых к фаговой терапии, тестировали в стандартном анализе зависимости «время-летальное действие». Результаты показывают, что в то время как LUZ19 дикого типа первоначально ингибирует рост PA7416, бактерии быстро становятся устойчивыми, а повторный рост происходит через 8-12 часов (фиг. 9Б). Однако, сконструированный UJZ\9+pyoS5 ингибирует повторный рост бактерий PA7416 на более, чем 24 ч после обработки фагом (фиг. 9В, 9Г).

[0290] Эти данные представляют собой пример использования способа конструирования *in vitro*, описанного в настоящем документе, для получения вируса с улучшенными вирусными свойствами, в частности в данном случае, предотвращения развития устойчивости к фагу у бактерий.

Пример IX

Система итеративного конструирования бактериофага для создания антимикробного продукта

[0291] Используя описанный в настоящем документе способ конструирования *in vitro*, геномы бактериофагов могут быть быстро сконструированы без обширной генетической манипуляции штаммом хозяина. Объединение вирусных мутационных исследований и методов селекции, хорошо известных специалистам в данной области техники, с полным секвенированием генома, сравнительной геномикой и раскрытом в настоящем изобретении способом конструирования *in vitro* создает новую и улучшенную систему для разработки новых и

улучшенных антимикробных препаратов. Система основана на итеративном улучшении 1, 2 или более 2 различных свойств в одном вирусном шасси для создания антимикробного препарата на основе вирусов. Последовательная очистка и редактирование генома LUZ19 для улучшения отдельных вирусных свойств были раскрыты (фиг. 6, 7 и 10), однако данный способ можно распространить на множество других бактериофагов *P. aeruginosa* или другого бактериофага, заражающего любые другие штаммы или виды бактерии. Кроме того, данный способ можно использовать для улучшения свойств нескольких отдельных бактериофагов, заражающих одни и те же виды бактерий, для создания превосходного коктейля бактериофагов, предотвращающего или лечащего бактериальные инфекции, заражения или изменения микробиомы.

[0292] Эти данные демонстрируют, как конструирование *in vitro* в сочетании с секвенированием генома, сравнительной геномикой и вирусными мутационными/селекционными исследованиями могут выполнять последовательно для достижения поэтапных улучшений или инженерных изменений для включения улучшенных вирусных свойств, представляющих интерес (фиг. 10).

Пример X

Способы

[0293] Гидовые РНК (гРНК) синтезировали и очищали с использованием коммерчески доступного набора для транскрипции *in vitro*, такого как набор MEGAscript T7 kit (Thermo Fisher). Гидовые РНК были разработаны с использованием методов, хорошо известных в данной области техники (фиг. 15).

[0294] Разбавьте *in vitro* транскрибируемые гРНК на рабочий материал 500 нг/мкл.

[0295] Реакции сборки без очищенной РНК-направляемой нуклеазы, такой как Cas9. Очищенный Cas9 (SEQ ID NO: 31) был получен из экспрессирующей плазмиды, содержащей последовательность генов, кодирующую His-меченый Cas9 (SEQ ID NO: 27) и очищающей ее с помощью известных способов никель-аффинной очистки. Необязательно используйте гРНК, которая сначала разрезает самую внутреннюю часть генома для итеративных расщеплений.

Полная реакционная смесь:мкл

10X Cas9 буфер* * 4

50 ммоль/л MgCl₂ 8

100 ммоль/л спермидин 4

гРНК1 2

гРНК2 2

Фермент Cas9 (0,45 мг/мл) 8 (общее количество)

гДНК X (общая масса 2 мкг)

дистиллированная H₂O X (до общего объема 40 мкл)

* Полная реакционная смесь может быть использована на одном этапе для одновременного вырезания нескольких сайтов (совместное расщепление), однако это может привести к низкой эффективности вырезания вирусной гДНК. Реакции совместного расщепления выполняют на льду перед добавлением Cas9 и инкубацией при 37 °C в течение 30 мин. Сконструированная 2-стадийная (или более) реакция также может быть выполнена, что обеспечивает более полное расщепление (описано ниже).

**10x Cas9 буфер содержит- 200 ммоль/л HEPES pH 7.4, 1.5 M KCl, 5 ммоль/л DTT и 1 ммоль/л EDTA pH8.

1 стадия реакции сборки и инкубация при комнатной температуре в течение 5 минут.

Реакционная смесь 1 стадии:мкл

10X Cas9 буфер 4

50 ммоль/л MgCl₂ 8

100 ммоль/л спермидина 4

гРНК1 2

гДНК общее количество 2 мкг)

дистиллированная H₂O X (до общего объема 36 мкл)

[0296] Инкубируйте на льду в течение 10 мин.

[0297] Инкубируйте при 37 ° C в течение 2 мин.

[0298] Добавьте 4 мкл фермента Cas9 (0,45 мг/мл). Инкубируйте при 37 °C в течение 30 мин.

[0299] 2 стадия реакции, добавление второй гРНК и

дополнительного фермента Cas9.

Реакционная смесь 2 стадии:

МКЛ

Реакционная стадия 1 стадии 40

гРНК2 2

Фермент Cas9 (0,45 мг/мл) 4

10X Cas9 буфер 1

дистиллированная H₂O 3

Общий объем 50 мкл

[0300] Инкубируйте реакцию 2 стадии при 37 ° C в течение 30 мин. Дополнительные шаги могут быть добавлены для расщепления генома в более чем 2 местах.

[0301] Инактивируйте фермент Cas9 путем инкубации при 80°C в течение 10 мин. Необязательно проведите очистку с использованием фенольно-хлороформной экстракции (повышает эффективность сборки фрагментов в сборке методом Gibson Assembly) или других способов инактивации, дезактивации или очистки, хорошо известных в данной области техники.

[0302] Исследуйте 5 мкл образца на агарозном геле для проверки правильности разрезания.

[0303] Для сборки *in vitro* с использованием метода сборки Gibson Assembly, соответствующую концентрацию продуктов расщепления и *in vitro* сконструированной вставки использовали в соответствии с протоколом метода сборки Gibson Assembly NEB.

[0304] После сборки *in vitro*, возможно, трансформируют в клетки-хозяева для амплификации сконструированного генома, части генома или восстановления сконструированного вируса.

Пример XI

Конструирование фага M13 *E. coli*

[0305] Используя описанный в настоящем документе способ конструирования *in vitro*, был сконструирован вирус, заражающий *Escherichia coli*, для экспрессии флуоресцентного репортера паприка (SEQ ID NO: 5). На фиг. 11A показана схема подхода конструирования *in vitro* для включения гена флуоресцентного белка паприка в геном фага M13 *E. coli*. Этот процесс конструирования был разработан для

создания лизогенного фага, экспрессирующего флуоресцентный репортер, который будет представлять собой улучшенное вирусное свойство, поскольку аналогичные вирусы использовали в качестве диагностики. Вирусный геном M13 (номер доступа X02513) был выделен из вирусных частиц. Поскольку экспериментальная конструкция включает использование двух гРНК, функциональность каждой отдельной гРНК была впервые подтверждена в отдельных реакциях Cas9-расщепления *in vitro* (фиг. 11В). Зная, что каждая гРНК была функциональной, сайт-специфическое расщепление выполняли с использованием РНК-зависимой нуклеазы и обеих *in vitro* транскрибируемых гРНК (фиг. 11В). Флуоресцентный репортерный ген *паприка* (SEQ ID NO: 29) ПЦР-амплифицировали (фиг. 11Г) с использованием праймеров, которые добавляли 5'- и 3'-последовательностям, гомологичным последовательностям, фланкирующим ген *LacZa*, который был выделен из генома M13 с использованием расщепления РНК-зависимой нуклеазой, например, Cas9. Метод сборки Gibson Assembly использовали для бесшовной вставки ПЦР-амплифицированного гена *паприка* в расщепленный геном M13, заменяя ген *LacZa* (SEQ ID NO: 28). Сконструированные геномы трансформировали непосредственно в хозяина *E. coli* для получения функциональных вирусных частиц, кодирующих ген *паприка*. Сконструированный фаг оценивали по его способности образовывать бляшки у *E. coli* (фиг. 11Д). Вирусную ДНК выделяли из бляшек и ПЦР-амплифицировали для подтверждения присутствия вставленного гена *паприка* (фиг. 11Е). Присутствие и функции рекомбинантного белка *паприка* подтвердили при помощи флуоресцентной визуализации (фиг. 11Ж).

[0306] Эти данные демонстрируют успешное использование описанного в настоящем документе способа конструирования *in vitro* для создания репортерного гена в геноме фага *E. coli*. Демонстрируя, что раскрываемый способ можно расширить на другой род вирусов, включая тот, который заражает другой род бактерий.

Пример XII

Конструирование фага X *E. coli*

[0307] Используя описанный в настоящем документе способ

конструирования *in vitro*, был отредактирован второй вирус, заражающий *Escherichia coli*. На фиг. 12А показана схема подхода конструирования *in vitro* для удаления гена *ell* (SEQ ID NO: 30) из выделенного генома фага X (доступ NC_001416.1). Данный технический процесс был разработан для создания конститутивно литического вируса, который будет представлять собой улучшенное вирусное свойство. Вирусный геном λ был выделен из вирусных частиц. Поскольку экспериментальная конструкция предполагает использование двух гРНК, функциональность каждой отдельной гРНК была впервые подтверждена в отдельных реакциях Cas9-расщепления *in vitro* (фиг. 12Б). Зная, что каждая гРНК была функциональной, сайт-специфическое расщепление проводили с использованием РНК-зависимой нуклеазы и обеих *in vitro* транскрибируемых гРНК (фиг. 12В). Две синтезированные одноцепочечные молекулы ДНК были отождествлены *in vitro* для получения шаблона для восстановления двухцепочечной ДНК (SEQ ID NO: 9), содержащего 5'- и 3'-последовательности, гомологичные последовательностям, фланкирующим Cas9-направленные вырезанные сайты в выделенный вирусный геном λ . Метод сборки Gibson Assembly использовали для бесшовной вставки ПЦР-амплифицированной восстанавливающей матрицы в расщепленный геном λ . Затем сконструированные геномы были упакованы *in vitro* с использованием набора Maxplax lambda packaging extraction kit из EpiCentre в соответствии со способом изготовителя (фиг. 12Г). После *in vitro* упаковки, сконструированные геномы λ были извлечены из анализа бляшкообразования с двойным агаровым слоем с использованием рекомендованных изготовителем клеток-хозяев *E. coli*. Было определено, что сконструированный фаг функционирует на основе его способности образовывать бляшки у *E. coli*. Вирусную ДНК выделяли из образовавшихся бляшек и ПЦР-амплифицировали, чтобы подтвердить отсутствие гена *ell* (фиг. 12Д).

[0308] Эти данные демонстрируют успешное использование описанного в настоящем документе способа конструирования *in vitro* для удаления нежелательного гена из генома фага *E. coli*. Эти данные также обеспечивают пример упаковки сконструированных вирусных

геномов *in vitro*, что повышает эффективность восстановления вируса и обеспечивает альтернативу прямой трансформации в клетку-хозяина. Кроме того, эти данные обеспечивают пример использования отожденных *in vitro* синтезированных олигонуклеотидов в качестве вставки для конструирования. Кроме того, эти данные являются еще одним примером использования этого подхода для конструирования генома фага, чтобы получить улучшенное вирусное свойство, а именно конститутивно литический фенотип. Наконец, эти данные показывают, что второй род вируса, заражающий *E. coli* может быть сконструирован с использованием описанного в настоящем документе способа конструирования *in vitro*.

Пример XIII

Коррекция ошибок ЦМВ человека

[0309] Используя раскрытый в настоящем документе способ конструирования *in vitro*, была отредактирована часть человеческого вируса. На фиг. 13А показана схема подхода конструирования *in vitro*, используемого для исправления ошибок. 18 т.п.н. часть ~230 т.п.н. вирусного генома ЦМВ человека содержалась в пределах плазмиды, реплицирующейся в *E. coli*. Настоящая часть генома ЦМВ человека (SEQ ID NO: 10) содержала начало вирусного генома и несла мутантный аллель RL13 (SEQ ID NO: 33). Вместе фрагмент ЦМВ человека и плазида *E. coli* имели размер примерно 28 т.п.н., что превышает спецификации большинства современных методов коррекции ошибок. Для исправления ошибок плазмиду 28 т.п.н. выделяли из *E. coli* и проводили сайт-специфическое расщепление с использованием РНК-зависимой нуклеазы и двух *in vitro* транскрибируемых гРНК (фиг. 13В). Cas9-опосредованное расщеплением вырезали область гена RL13 непосредственно в прямом и обратном направлении от сайта мутации. Исправленная область гена RL13 (SEQ ID NO: 32) была синтезирована и ПЦР-амплифицирована с дополнительными 5'- и 3'-фланкирующими последовательностями, гомологичными областям, граничащим с каждым сайтом расщепления, специфичным для РНК (фиг. 13В). Метод сборки Gibson Assembly использовали для бесшовной вставки синтезированной восстанавливающей матрицы в расщепленную плазмиду. Исправленный RL13-содержащий фрагмент ЦМВ человека (SEQ ID NO: 11),

содержащийся внутри плазмиды, затем трансформировали в *E. coli* и восстанавливали на антибиотикосодержащих питательных средах. Колонии *E. coli* подвергали скринингу с помощью ПЦР для подтверждения наличия исправленного гена RL13, который содержал дополнительную последовательность по сравнению с геном RL13, содержащим ошибки, что позволяет отличать его от гена RL13, содержащего ошибки (фиг. 13Г). Геномный фрагмент с исправленной ошибкой затем амплифицировали в *E. coli* с использованием стандартных методик для последующего использования в обратных приложениях.

[0310] Эти данные демонстрируют успешное использование описанного в настоящем документе способа конструирования *in vitro* для конструирования генов из генома вируса человека и дополнительно обеспечивают способ использования синтезированной ДНК в качестве восстанавливающей матрицы в реакции сборки *in vitro*. Эти данные также демонстрируют использование этого способа конструирования *in vitro* для коррекции ошибок ДНК или плазмид, которые слишком велики для стандартных методов коррекции ошибок. Стандартная методика коррекции ошибок имеет ограничение по размеру около 5 т.п.н. и основана на ПЦР, которое по своей природе может создавать более нежелательные ошибки. Представленный в настоящем документе способ конструирования *in vitro* не зависит от ПЦР-амплификации всей или даже большей части плазмиды или вирусного генома и поэтому поддается применению при исправлении ошибок последовательностей, превышающих 5 т.п.н.

Пример XIV

Быстрая идентификация терминально избыточных вирусных концов

[0311] Описанный в настоящем документе способ расщепления *in vitro* также может быть адаптирован для идентификации точных концов терминально избыточных вирусных геномов. На фиг. 14 показана схема подхода расщепления *in vitro*, который использовался для определения концов фаговых геномов LBL3 и 14-1. LBL3 и 14-1 (номер доступа NC_011703.1) фаговую геномную ДНК очищали от вирусных частиц (фиг. 14А). Секвенирование нового поколения выполняли с использованием платформы MiSeq или PacBio, а затем при помощи

автоматического слияния высококачественных считываний ДНК в более длинные сборки для восстановления исходной последовательности (фиг. 14В). Как правило, программное обеспечение автоматической сборки неправильно собирает вирусные или бактериофаговые геномы в круговые контиги и размещает ПТП терминально повторяющихся геномов во внутреннюю область вирусной последовательности. Прогнозирование *in silico* физических концов генома выполняют на основе идентификации областей секвенирования двойного охвата и результатов поиска BLAST, которые соответствуют близкородственному терминально повторяющемуся геному (фиг. 14В). Данные прогнозируемые концы были подтверждены расщеплением эндонуклеазой Cas9. После инактивации Cas9 фрагменты ДНК, соответствующие геномным физическим концам, очищали и секвенировали (фиг. 14Г). Эти результаты секвенирования привели к точной сборке генома на основе истинных физических концевых последовательностей (фиг. 14Д).

[0312] Одной из самых больших технических проблем, связанных с секвенированием генома фага, является точное отображение геномных физических концов из-за их повторяющегося характера. Эти сегменты могут простираться от 4-14 п.о. в циклически перегруппированных геномах (например, большинство фагов *Mycobacterium* и *Propionibacterium acnes*) до нескольких сотен пар оснований в терминально повторяющихся геномах (например, ФКМV-подобные, PBl-подобные и N4-подобные фаговые роды *P. aeruginosa*) и даже до нескольких тысяч пар оснований (например, T5 и DTR *E. coli*). Сопоставление повторяющихся концов (или ПТП – прямых терминальных повторов) в настоящее время выполняется комбинацией глубокого анализа последовательностей (для идентификации фрагментов ДНК с двойным покрытием), праймер-опосредованной прогулкой (секвенирование по Сэнгеру), идентификацией основных разрывов ДНК и анализом рестрикционных эндонуклеаз. Однако каждый из этих подходов часто ограничен в использовании или безрезультативный: I) плохо определенные двойные сиквенсы границы охвата двойного упорядочения в данных NGS (секвенирования следующего поколения); (II) считывание праймер-опосредованной

прогулки с прохождением через конкатэмеры ПТП, дающая неубедительные результаты; (III) низкая частота мест рестрикции вблизи фаговых концов или обструкция рестрикционных участков вследствие модификаций ДНК, таких как метилирование. Использование направленного Cas9-расщепления ДНК фага в определенных положениях устраняет необходимость в ненадежных или громоздких анализах или процедурах и значительно упрощает идентификацию фаговых геномных физических концов. Такой подход имеет потенциал для точного отображения концов уже секвенированных фаговых геномов (как показано на примере картирования ПТП LBL3 и 14-1), а также для быстрой идентификации ПТП новых идентифицированных вирусов.

[0313] Использование направленного Cas9-расщепления в пределах описанного в настоящем документе способа конструирования *in vitro* для сопоставления физических концов терминально повторяющихся фаговых геномов представляет собой явное преимущество по сравнению с существующими подходами, поскольку оно не зависит от тонких изменений в охвате секвенирования и может выполняться независимо от образования конкатемера. Кроме того, активность Cas9 менее чувствительна к модификациям ДНК, чем многие рестрикционные ферменты.

[0314] Эти данные показывают успешное применение РНК-направляемого Cas9-расщепления *in vitro*, что дает возможность идентифицировать правильное положение последовательности фагового генома. Эта информация затем может быть использована для разработки нижерасположенных подходов модификации *in vitro* для конструирования этих фагов, что было ранее невозможным из-за отсутствия истинных границ генома.

Пример XV

Способ конструирования со сборкой *in vivo*

[0315] Настоящее раскрытие обеспечивает способ *in vitro* сайт-специфического расщепления очищенной вирусной нуклеиновой кислоты с использованием РНК-направляемой нуклеазы; и сборку сконструированной нуклеиновой кислоты путем вставки фрагмента ДНК или РНК в расщепленную вирусную нуклеиновую кислоту. Хотя рекомбинантная нуклеиновая кислота может быть собрана целиком в

условиях *in vitro* с использованием очищенных ферментов, как описано в настоящем документе, этот процесс также может быть осуществлен с использованием естественных или сконструированных рекомбинантных сигнальных путей в чувствительном штамме хозяина. Трансформация очищенных и обработанных *in vitro* вирусных геномов вместе с фрагментом вставки восстановления, содержащим концевые области гомологии, достаточна для того, чтобы некоторые клетки-хозяева собирали рекомбинантный вирусный геном *in vivo*. Фрагменты вставки восстановления могут быть синтезированы или амплифицированы стандартными методами, известными в данной области техники, или могут находиться внутри плазмид, стабильно реплицирующихся в выбранной клетке-хозяине. Данный способ, вероятно, будет иметь более низкую эффективность по сравнению со сборкой *in vitro* из-за клеток-хозяев, имеющих как гомологичные, так и не гомологичные пути восстановления ДНК, задача совместной доставки достаточного количества вставки и расщепленного генома в клетку-хозяина и более низкой эффективности большинства гомологичных сигнальных путей рекомбинации хозяина. Поскольку только расщепленные геномы не образуют функциональных вирусных частиц и в последующем бляшек без опосредованной хозяином рекомбинации, бляшки, полученные после трансформации и выращивания, могут быть скринированы с помощью ПЦР для данной вставки, чтобы подтвердить корректную сборку желаемой сконструированной вирусной нуклеиновой кислоты.

Пример XVI

Сконструированные вирусы, описанные в настоящем документе

[0316] В таблице 1 представлены сконструированные вирусы, полученные в соответствии с настоящим изобретением в способе модификации *in vitro*. В таблице 2 представлены сконструированные вирусы, описанные в настоящем документе, вместе с соответствующим примером и фигурой. В таблице 3 перечислены вирусы дикого типа, описанные в настоящем документе, и номера доступа для их полной геномной последовательности. В таблице 4 перечислены некоторые из последовательностей нуклеиновых кислот дикого типа, описанных в настоящем документе, и соответствующие аминокислотные

последовательности.

Таблица 1. Сконструированные вирусы, описанные в данном документе

Сконструированный вирус	Исходный Вирус	Тип мутации	Целевая область	Номер доступа, положение нуклеотида (SEQ ID NO.)	Изменение нуклеотида и аминокислоты или добавление последовательности
LUZ19+ фрагмент <i>gp7</i> ФKF77	LUZ19	Замена	<i>gp7</i> (SEQ ID NO:23)	Доступ NC_010326.1, 4288– 4491 (SEQ ID NO:23)	Фрагмент <i>gp7</i> ФKF77 (SEQ ID NO:8)
LUZ19+LKD16 <i>gp18</i>	LUZ19	Замена	<i>gp18</i> (SEQ ID NO:50)	Доступ NC_010326.1, 11368–11688 (SEQ ID NO:24)	<i>gp18</i> LKD16 (SEQ ID NO:7)
ШКX-LUZ19	LUZ19	TM	<i>gp13</i> (SEQ ID NO:1)	Доступ NC_010326.1, 7325 (положение 50 SEQ ID NO:1)	G на A, C17Y
		TM	<i>gp18</i> (SEQ ID NO:50)	Доступ NC_010326.1, 11469 (положение 106 SEQ ID NO:50)	G на T, D36Y
		TM	<i>gp38</i> (SEQ ID NO:2)	Доступ NC_010326.1, 36462 (положение 245 SEQ ID NO:2)	A на G, D82G
		TM	<i>gp38</i> (SEQ ID NO:2)	Доступ NC_010326.1, 36464; 36465 (положение 247, 248 SEQ ID NO:2)	AT на TC, I83S
		TM	<i>gp40</i> (SEQ ID NO:2)	Доступ NC_010326.1,	A на G, N253D

			N0:3)	38180 (положение 757 of SEQ ID NO:3)	
LUZ19+gp34 L55Δ (LUZ19*)	LUZ19	Делеция	gp34 (SEQ ID N0:4)	Доступ NC_010326.1, 26664-26666 (положение 163- 165 SEQ ID NO:4)	CTG на -, L55
LUZ19+LKD16 gp18+gp34 L55A	LUZ19+ LK D16 gp18	Делеция	gp34 (SEQ ID N0:4)	Доступ NC_010326.1, 26664-26666 (положение 163- 165 SEQ ID NO:4)	CTG на -, L55
LUZ19+ gp49 LKA1	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID N0:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) gp49 LKA1 (SEQ ID NO:12) T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+ gp34 NTU	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID N0:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) NJ\Jgp34 (SEQ ID NO:13) T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+Pp15g p4 4	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID N0:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) Pp15gp44 (SEQ ID NO:14) T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+SaPSM a3	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID N0:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) SaPSMa3 (SEQ ID NO:16)

					T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+SaPSM b2	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID NO:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) SaPSMb2 (SEQ ID NO:17) T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+SePSM a	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID NO:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) SePSMa (SEQ ID NO:18) T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+dspS	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID NO:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) dspB (SEQ ID NO:15) T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+Pp15g p4 4	IIIKX LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID NO:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	Pp15gp44 (SEQ ID NO:14)
LUZ19+SePSM a	IIIKX LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID NO:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	SePSMa (SEQ ID NO:18)
LUZ19+PPR1L	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID NO:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) PPR1 L (SEQ ID NO:20) T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+MSR L	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQ ID NO:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) MS2 L (SEQ ID NO:22)

				ID NO:25)	NO:19) T32 (SEQ ID NO:22)
LUZ19+pyoS5	LUZ19	Вставка	gp49 (SEQID NO:51)	Доступ NC_010326.1, 42719-42943 (SEQ ID NO:25)	P32 (SEQ ID NO:21) pyoS5 (SEQ ID NO:6) T32 (SEQ ID NO:22)
M13MP18+пап рика	M13MP1 8	Замена	lacZ (SEQID NO:28)	Доступ X02513, 6216-6722 (SEQID NO:28)	паприка (SEQID NO:29)
Лямбда cll удаление	лямбда	Делеция	ell (SEQID NO:30)	Доступ NC_001416.1, 38390-28623 (SEQ ID NO:30)	ell удаленная (SEQID NO:9)
ЦМВ человека+от редактирова нный RL13	Фрагме нт ЦМВ Челове ка	Замена	RL13 (SEQID NO:33)	Неотредактирова нный полноразмерный фрагмент (SEQ ID NO:10) и неотредактирова нный RL13 (SEQ ID NO:33)	Отредактированн ый RL13 (SEQID NO:32) и отредактированн ый полноразмерный фрагмент (SEQ ID NO:11)

TM- точечная мутация, замена - замена, делеция - удаление,
вставка - инсерция

Таблица 2. Сконструированные вирусы, описанные в настоящем документе

Сконструированный фаг	Пример	Фигура	Свойство
LUZ19+ фрагмент <i>gp7</i> ФКФ77	1	2	Сконструированный ОП
LUZ19+LKD16 <i>gp18</i>	II	3	Расширение круга хозяев

ШКХ-LUZ19	III	4	Расширение круга хозяев
LUZ19+gp34 L55Δ (LUZ19*)	IV	5	Улучшенная литическая активность
LUZ19+LKD16 gp18+gp34 L55Δ	V	6	Итеративное конструирование
LUZ19+LKA1gp49	VI	7	Дисперсия биопленки
LUZ19+ gp34 NTU	VI	7	Дисперсия биопленки
LUZ19+Pp15gp44	VI	7	Дисперсия биопленки
LUZ19+SaPSMa3	VI	7	Дисперсия биопленки
LUZ19+SaPSMb2	VI	7	Дисперсия биопленки
LUZ19+SePSMa	VI	7	Дисперсия биопленки
LUZ19+dspS	VI	7	Дисперсия биопленки
ШКХ-LUZ19+Pp15gp44	VI	7	Итеративное конструирование
ШКХ-LUZ19+SePSMa	VI	7	Итеративное конструирование
LUZ19+PPR1L	VII	8	Антибиотическая сенсibilизация /предовращение устойчивости к фагу
LUZ19+MS2 L	VII	8	Антибиотическая сенсibilизация /предовращение устойчивости к фагу
LUZ19+pyoS5	VIII	9	Предовращение устойчивости к фагу
M13MP18+паприка	XI	11	Сконструированный ОП
делеция c11 λ	XII	12	Сконструированный ОП
ЦМВ человека+отредактиро ванный RL13	XIII	13	Коррекция ошибок/сконструированный ОП

ОП- опытный образец

Таблица 3. Вирусы дикого типа, описанные в настоящем документе

Название вируса дикого типа	Геномная последовательность
Фага LUZ19 <i>P. aeruginosa</i>	Доступ NC 010326.1
Фаг <i>E. coli</i> \ dl 857 SAM7	Доступ NC 001416.1
Фаг M13 <i>E. coli</i>	Доступ X02513
Фаг 14-1 <i>P. aeruginosa</i>	Доступ NC_011703.1

Таблица 4. Последовательности дикого типа, описанные в настоящем документе

Название	Последовательность нуклеиновой кислоты	Аминокислотная последовательность
gp13 LUZ19	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:34
gp38 LUZ19	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:35
gp40 LUZ19	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:36
gp34 LUZ19	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5
gp49 LUZ19	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:49
gp18 LUZ19	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:48
gp18 LKD16	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:38
gp49 LKA1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO:39
PyoS5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:37
gp34 NTU	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO:40
gp44 Pp15	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO:41
DspB	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO:42
SaPSMa3	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO:43
SaPAMb2	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO:44
SePSMa	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO:45
MS2L	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO:46
PRR1 L	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:47

[0317] Из вышеприведенного описания специалист в данной области техники может легко определить основные характеристики настоящего раскрытия и не отходя от его сущности и объема, может вносить изменения и модификации в настоящее раскрытие, чтобы адаптировать его к различным условиям применения и использования, а также реализовывать настоящее раскрытие в полном объеме. Предшествующие конкретные варианты реализации настоящего изобретения должны толковаться как просто иллюстративные, а не ограничивающие объем раскрытия каким-либо образом. Полное раскрытие всех заявок, патентов и публикаций (включая справочные руководства), упомянутых выше и на фигурах, полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название- *gp13* LUZ19 дикого типа

GTGCTGGCCCTCGGTGCCTTCGACCTGTCCGGCCTGATGGTAGGTTCCCTGCCTCGTAGTAGGTG
GTGAGCTG

AAGGCCCTGTGCGTTGATGACCGGCACAGCAGGCAGGGTATCGGCGCTGAGCTGGTACGGGCCG
CTGAGCT

GGCTGGTGCCGAGTATCTGACCTGCTTCGAGTTCCTGGAGCCGTTCTACGCCGACTTGGGCTGG
AGCACAC

CCACCGCGAGGCGAACTGGACAGCAGGAGAGCCGGACGTGCTGCACATGAGGGCACCCGGTCAT
GACGTAT

GA

SEQ ID NO:2

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название- *gp38* LUZ19 дикого типа

GTGGCTCGGTTCAAGAATCCCGAGACCATCCACGTTGCAGATGGGGTCGAGGCTGTCTTCAGTC
TCGACTTC

CCGTTCTGCGGCGTGAGGACGTATTTCGTCCAGGTCGATAAGATACTCGTCACCGACTATACGT
GGGTAGAC

GACACCAACATCCAATTGGCCGTGGTGCCGAAGAAGGACCAAGAGGTCCGCATCTTCCGCGACA

CGCCCCG
CCAGGTCCCGGACACACAGTTCAGCCAGGACATCCCGTTCCTGCCTCGATACATCGACGCGAAC
AACAAAGC
AGCTCCTGTACGCTGTGCAGGAAGGCATCAACACCGCGAACCTCGCTCTCGATGGCGTACTCGA
CGCGATCC
GTATCGCCGAGGAGGCTCGTCGCCTGGCGCAGGAAGCACTCGACGCCGCCAATGAGGCGCTTCG
CCGTGCC
CTGGGCTTCGCTGAGATTCGCACCGTGACCGAGGACTCGGACATCGATCCGAGCTGGCGCGGTT
ACTGGAAC
CGTTGCATCACCGCCGATAAACCTCTGACCCTGACCATGCAGATGGAAGACCCGGATGCACCGT
GGGTCA
GTTAGCGAGGTTCACTTCGAGCAGGCCGGTGTGCGTGACCTAAACATCGTAGCCGGTCTTGGC
GTTACCAT
CAACCGTTTGCAGAACACCACCATGCAGCTCTACGGCGAGAATGGCGTGTGTACTCTCAAGCGG
CTGGGCGC
TAACCACTGGATCGTGTTCTGGGGCCATGGAGGACGAATAA

SEQ ID NO:3

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название- *gp40* LUZ19 дикого типа

ATGTTTAAAGACCGAAGTAAAGGGACGTTACACCCTGATTCGCCGCAAGGCGGACGGCACTCCGG
TGGAGAC
TCTGGAGTTCGACAACATCATTACGAATGCGGGCCTGGATTGGATCGCCGCTATGGATACCGAC
CTCATGGG
CGAACCCGTAGCGGTCAGCACTTCTACAGCCGATCCCAACCCGAGCGCACCCGCCATCCCGGAG
GTTGTGCA
ACGCACGTCCGCATCTGCCCCTGGTGGAGGTACTACGTCGGGCCTGGATGGCGAGTGGCTGTTC
TGGCGGAG
GCGTTGGAGATTCCCGCAGGGCACCCCTAGCTGGTCAAGTCCTGGCCACCGTGGGCCTCATCTGC
AACTCGGA
TCGTCGCTTCGAGAGTAACACGGGTGAGCTGATCCCGAAGGATACCCCGCTGTCGTACACTCGC
ATCAAGGA
CGCCGCCGGGCAGCCTACTACTCTGGTGGTGGCCGCTGACGAGATTCTGGATGTCCAGTACGAG
TTCCGCAG
CCGGCCCCGTAGGAACGGCTGAGGCCAAGTTCGTGATCTCCGGCGTGGAACGCACCTTCCGGCTG

ATCCCAA

GCCTTTTGCGAACCGTGCTAATCTCTCCGGGGAACGCTACATCTTCTACAACACCAACCCCTAC
ATCAACGG

CAAGGACGCCTCCGGCGGCAATGTCCGAGACGGTCAGTGGCAGAAGAAATATCCCAAGTACGTG
CGCGGCT

CCTACAAGGCGCAGATCACGCTGCTGGCCCAGGTCCAGAACGGCAATATGGCTGGCGGCATCAC
CGGCACC

GAGGAACTCCAGATTTACAATGGACGTAACCTATGTGCTCGATATCAACCCGCCTGTTGTGAAGA
ACAATACC

CAGGAGTTCACCGTGACCCTGGAGTTTACGGTGGCGAGGGCATAA

SEQ ID NO:4

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название- gp34 LUZ19 дикого типа

ATGAGCTACAAGCAATCCGCGTATCCCAATCTGCTGATGGGTGTGAGCCAGCAGGTGCCCTTCG
AGCGCCTG

CCGGGCCAGCTCAGCGAGCAGATCAACATGGTATCCGATCCCGTGTGAGGACTTCGGCGGCGCA
GCGGTAT

CGAGCTGATGGCCACCTGCTGCATACCGACCAGCCCTGGCCGAGGCCGTTCTCTACACACG
AACCTCGG

TGGCCGCAGCATTGCGATGCTGGTGGCGCAGCACCGTGGCGAGCTGTACCTGTTGACGAGCGG
GACGGTC

GCCTGCTGATGGGTGAGCCCTGGTGCATGACTACCTCAAGGCCAACGATTACAGGCAGCTACG
GGCCGCCA

CGGTGGCCGATGACCTGTTTCATCGCCAACCTGAGTGTAAGCCCGAGGCCGACCGCACCGACAT
CAAGGGC

GTAGACCCCAACAAGGCCGGCTGGCTGTACATCAAGGCAGGCCAGTATTGGAAGGCATTCTCCA
TGACCATC

AAGGTCAAGGACAACGCCACCGGCACACCTACAGCCACACGGCCACCTACGTGACGCCGGACA
ACGCCAG

CACGAACCCCAACCTCGCTGAGGCGCCATTCCAAACGAGCGTAGGCTACATCGCGTGGCAGCTC
TACGGCA

AGTTCTTCGGTGCGCCGGAGTACACTCTGCCCAACTCGACGAAGAAGTACCCGAAGGTAGACCC
GGACGCC

AACGCGGCAACCATAGCCGGTTACCTCAACCAACGGGGCGTGCAGGACGGGTACATCGCGTTCC

GTGGCGA
CGCCGATATCCACGTTGAAGTGTCCACGGACATGGGCAACAACCTACGGCATAGCCTCCGGCGGT
ATGAGCCT
CAACGCCACGGCAGACCTGCCGGCCTTACTGCCGGGCGCGGGTGCTCCTGGCGTGGGTGTGCAG
TTCATGGA
CGGCGCTGTCATGGCCACCGGCTCCACCAAGGCCCCGGTATACTTCGAGTGGGATTCCGCTAAC
CGCCGCTG
GGCAGAGCGGGCCGCCTACGGCACCGATTGGGTCTGAAGAAGATGCCACTGGCCCTGCGCTGG
GATGAGG
CTACCGACACCTACAGCTTGAACGAGCTGGAGTATGATCGACGTGGCTCCGGCGACGAGGATAC
GAACCCC
ACGTTCAACTTCGTCACCCGAGGCATCACCGGCATGACGACCTTCCAGGGTCGCCTCGTCCTCC
TGTCGCAG
GAGTACGTCTGCATGTCGGCCAGTAACAATCCACACCGCTGGTTCAAGAAGTCGGCAGCCGCGC
TGAACGA
CGATGATCCTATCGAGATCGCAGCCCAGGGGAGCCTGACTGAACCGTACGAGCACGCGGTCACC
TTCAACA
AGGACTTGATCGTCTTCGCCAAGAAGTATCAGGCCGTGGTCCCCGGTGGCGGCATTGTAACTCC
CCGGACGG
CGGTTATCAGCATCACACGCAGTACGACCTCGATAACCAGGGCGGCACCTGCCGTGACTGGCCG
CAGTGTGT
ACTTCGCTGCGGAGCGTGCCCTGGGTTTCATGGGCCTGCATGAGATGGCCCCGTCTCCGTCCAC
GGACAGCC
ACTACGTCGCCGAAGACGTTACCAGCCACATCCCGAGCTACATGCCGGGGCCTGCTGAGTACAT
CCAGGCG
GCGGCCTCCAGCGGCTACCTGGTGTTTCGGCACCAGCACGGCGGACGAGATGATCTGCCACCAGT
ACCTCTGG
CAGGGCAACGAGAAAGTGCAGAACGCGTTTCATCGCTGGACGTTGCGGCATCAGATCATCGGCG
CCTACTTC
ACTGGTGACAACCTGATGGTTCTGATTCAGAAGGGCCAGGAGATCGCCCTGGGACGGATGCACC
TGAACAG
CCTGCCAGCCCGTGAGGGTCTGCAATACCCTAAATACGACTACTGGCGGCGTATCGAGGCGACC
GTCGATGG
TGAGCTGGAACCTGACCAAGCAGCATTGGGACCTGATCAAGGATGCCTCTGCCGTGTACCAGCTA
CAGCCTGT

GGCCGGCGCCTACATGGAGCGTACCCATCTCGGCGTGAAGCGCGAGACGAATACGAAGGTGTTC
CTCGACG
TGCCCCGAGGCCGTGGTCGGGGCGGTGTATGTGGTCGGCTGCGAGTTCTGGTCGAAGGTGGAGTT
CACTCCGC
CGGTTCTCCGGGACCACAATGGCCTGCCCATGACCTCGACCCGTGCAGTGCTTCATCGGTACAA
CGTAAACT
TCGGCTGGACCGGCGAGTTCCTGTGGCGCATCAGCGACACGGCTCGACCCAACCAGCCGTGGTA
CGACACG
ACGCCCCCTCCGGTTGTTTCAGCCGGCAACTCAATGCCGGGGAGCCTCTGGTGGATAGCGCTGTGG
TGCCGCTG
CCGGCACGGGTTCGATATGGCCACGTCCAAGTTCGAGCTGAGCTGTCACAGTCCGTACGACATGA
ACGTTCGG
GCTGTCGAGTACAACCTCAAGTCCAACCAAACCTACAGGAGGGTGTGA

SEQ ID NO:5

Белок

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название- белок Gp34 LUZ19 дикого типа

MSYKQSAYPNLLMGVSQQVPFERLPGQLSEQINMVSDPVSGLRRRSGIELMAHLLHTDQPWPRP
FLYHTNLGGR
SIAMLVAQHRGELYLFDERDGRLLMGQPLVHDYLNKANDYRQLRAATVADDLFIANLSVKPEADR
TDIKGVDPN
KAGWLYKAGQYSKAFSMTIKVKDNATGTTYSHTATYVTPDNASTNPNLAEAPFQTSVGYIAWQL
YGKFFGAPE
YTLPNSTKKYPKVPDPANAAITAGYLNQRGVQDGYIAFRGDADIHVEVSTDMGNNYGIASGGMS
LNATADLPA
LLPGAGAPGVGVQFMDGAVMATGSTKAPVYFEWDSANRRWAERAAYGTDWVLKKMPLALRWDEA
TDTYSL
NELEYDRRGSGDEDTNPTFNFVTRGITGMTTFQGRLVLLSQEYVCMSASNNPHRWFKKSAAALN
DDDPIEIAAQ
GSLTEPYEHAVTFNKDLIVFAKKYQAVVPGGGIVTPRTAVISITTQYDLDTAAPAVTGRSVYF
AAERALGFMGL
HEMAPSPSTD SHYVAEDVTSHIPSYMPGPAEYIQAAASSGYLWGTSTADEMICHQYLWQNEKV
QNAFHRWTL
RHQIIIGAYFTGDNLMVLIQKGQEIALGRMHLNSLPAREGLQYPKYDYWRRRIEATVDGELELTKQ
HWDLKDASA

VYQLQPVAGAYMERTHLGVKRETNTKVFLDVPEAVVGAVYVVGCEFWKVEFTPVL RDHNGLP
MTSTRAVL
HRYNVNFGWTGEFLWRISDTARPNQPWYD TTPLRLFSRQLNAGEPLVDSAVVPLPARVDMATSK
FELSCHSPYD
MNVRAVEYNFKSNQTYRRV

SEQ ID NO:6

ДНК

Род/вид- *Pseudomonas aeruginosa*

Описательное название- последовательность PyoS5

ATGTCCAATGACAACGAAGTACCTGGTTCCATGGTTATTGTCGCACAAGGTCCAGACGATCAAT
ACGCATAC
GAGGTTCCCCCTATCGATAGCGCGGCCGTTGCCGGGAATATGTTTGGCGACTTAATTC AAAGAG
AAATATAT
CTACAGAAAAACATTTATTATCCAGTCCGATCTATTTTTGAACAAGGAACAAAAGAAAAGAAGG
AGATCAA
CAAGAAAGTATCTGATCAAGTCGATGGCTTGCTAAAGCAGATCACTCAAGGAAAAAGGGAGGCC
ACAAGGC
AAGAGCGAGTCGATGTCATGTCGGCAGTCCTGCACAAGATGGAATCTGATCTTGAAGGATACAA
AAAGACC
TTTACCAAAGGCCCATTCATTGACTACGAAAAGCAGTCAAGCCTCTCCATCTATGAGGCCTGGG
TCAAGATC
TGGGAGAAGAACTCTTGGAAGAAAGAAAGAAGTACCCTTTTCAGCAGCTTGTTAGAGATGAAC
TGGAGCG
GGCGGTTGCCTACTACAAACAAGATTCACCTCTCTGAAGCGGTAAAAGTGCTAAGACAGGAGCTC
AACAAGC
AAAAAGCGCTAAAGGAAAAAGAGGACCTCTCTCAACTGGAGCGGGACTACAGAACCCGAAAGGC
GAATCT
CGAGATGAAAGTACAATCCGAGCTTGATCAAGCGGGAAGTGCTTTGCCTCCATTGGTCAGTCCA
ACGCCAGA
GCAATGGCTTGAACGTGCCACAAGACTGGTTACGCAAGCAATTGCTGATAAAAAGCAGCTGCAG
ACCACAA
ACAATACTCTTATCAAGAATTCCCCAACCCCTCTAGAAAAGCAGAAAGCCATCTACAATGGTGA
GCTACTTG
TGGATGAGATAGCCAGTCTACAGGCCCGCTTAGTTAAGCTGAACGCCGAAACGACACGACGCAG
GACAGAA

GCAGAACGCAAGGCGGCCGAGGAACAAGCGTTGCAAGATGCTATTAAATTTACTGCCGACTTTT
ATAAGGA
AGTAACTGAGAAATTTGGCGCACGAACATCGGAGATGGCGCGCCAACTGGCCGAAGGCGCCAGG
GGGAAA
AATATCAGGAGTTCGGCGGAAGCAATCAAGTCGTTTGAAAAGCACAAGGATGCGTTAAATAAAA
AACTTAG
CCTTAAAGATAGGCAAGCCATTGCCAAAGCCTTTGATTCTCTAGACAAGCAGATGATGGCGAAG
AGCCTTGA
GAAATTTAGCAAAGGCTTTGGAGTTGTAGGCAAAGCTATTGACGCCGCCAGCCTGTACCAAGAG
TTCAAGAT
ATCTACGGAAACCGGGGACTGGAAACCATTTCTTTGTAAAAATTGAAACACTAGCTGCTGGTGCG
GCCGCCA
GTTGGCTTGTGGGTATTGCATTTGCCACGGCAACAGCCACTCCTATAGGCATTCTGGGGTTCGC
ACTGGTAAT
GGCAGTTACCGGGGCGATGATTGACGAAGACCTTCTAGAAAAAGCAAACAATCTTGTAATATCC
ATTTAA

SEQ ID NO:7

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LKD16

Описательное название - добавлена последовательность gp18
LKD16

GAGTACCAACTGAACACGAGCGCACCCCTGCGCTGCCTGCTCCAAGACATCCACGGGCCGCTGAA
TCTGCTGT
TCCCAGGTATCCGGGTGAAGGTGGAGGAGGCGTGCCTCGGATACTTGGGCTACAGGGAGCGGGG
CTATTGG
GAGCTGCGCCTCCAGGTGGACTACGACCACCCGAAGCTTGGGCACCTCCGCTACAGTCAGGCCG
TGCCGGA
GTACGTGCTGATCAACGACCGCGACAGCATCATCAAGTACCTGATGGAAGCAGTCCCTCGGCAG
GTACTAG
AGGGCATGCTCAATAAGGCCAGGAATTCGTAACCAAGAACTGGTATTCCCTATGACGAC

SEQ ID NO:8

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus phi-KF77

Описательное название - добавлена последовательность gp7
ΦKF77

TACAAGGTGGTGACGCCTAGCTCGGCAGAGGGCGCCGTTGTGCTGGCGACCAAGCAGACGCCTG
CCCTCGC

TCAGGCAGTCATCGTACTGCACAGCATGAACCCCGCGCAGTACGCGGTGGGCACGGCCATACTA
AACACAG

ACTGGCGGTGCCGCCGCCTGGGTGCCGGCGAGTACATCAAGCTCGTTCAAGGGGAGGCCGAC

SEQ ID NO:9

ДНК

Род/вид- *Lambdavirus* лямбда

Описательное название- *ell* фага λ *E. coli*

ATGGTTTCGTGCAAACAAACGCAACGAGGCTCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGA

SEQ ID NO: 10

ДНК

Род/вид - цитомегаловирус ЦМВЧ

Описательное название - предварительное редактирование
фрагмента ЦМВЧ

ACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGATTAC
CCTGTTAT

CCCTACCATTCCGGGCCGTGTGCTGGGTCCCCGAGGGGCGGGGGGGTGTTTTTAGCGGGGGGGT
GAAATTTG

GAGTCTTGAGCCGCGTGTGCTGTGGAGGACGGTGACGGTGGTAAGAGTGTGCTGCGGTGCGGT
TGGGACG

GCGGCGGCGAATAAAAGCGGCGTGCGGCGCGCACGGCGAAAAGCAGACGCGCGTCTGTGTTGTG
TGTCTTT

GACCGCGGCGGAACACACGCGGAAAAGCGAGTCCCAGGGGACACACGACGAGCGAGTCCCAGGG
GGGGAC

GACGACGGCCAGGGACGCGGAAACGACGCGGAAAAGAGGAAGTCCCCAGGGGGACGGGCGGAAA
AGAGG

AAGCGCCTAGGGGACCGCGGGGGCAGGAACAGACGAAGTACGCCGCAACCCGCGTCGAGGACAC
ACGCAG

AAGCGGCCGCCAGGGGAGGGGGGGGGGGGGGACTCGCGGGCCCCGGGGCACACTTGTTGTTCCC
TCCGGCC

GCCGACACGCACCCCGAAGCCGCGCACACCGCCGACACACCCCTGACACACCCGCGACACACCC
GCCACAC

GCCCGACACACGCCCCGCGACACACCCGACCGACACACCCTGACACACCCCGCCAACACACCCAG
CCGCACC

CGCCCCGCCAACACACCCCCGACACACCCGACACACGCCCCGCGACACACCCGGCACACACCCAC
CCACCCA
GCCGCGCCCCCGACACACCCCGAACGGCGCCGGTGCGGGACAGGGCTCACGGAGGTTTGCGGGC
CGTGAGC
ACGCCTCCCTTTGTACACACTACCGGTGCGTGGCGTCCCACGCTATTTGTTGCGGAGACCGGAC
TAAGGGAG
GTTTGCGGTGCGTCAGCGCGGGGCGGCGTTTGCGGCGTGTTTCGACCAGCGCTTTGTGCGCGCT
GCCTGTGC
GTGTCGTCCCATGGTCTTTGTCAGCGGCACGGCGCTGGGGACGGGGTTTCACCGCGCTGAGGGA
TCTTTCTG
CGGGTGTGAGGGACGGAGCTTTTTTCGCACGCTGGGCACCGGGCTGGGGGACGGGGGGTGTGCG
GGACGGC
GGTGGGGCCGGGGCGTTGCGGGTACGGGGATTACGCTGGGAACGGGGACTCGCGGACCCGGGCT
GAGGGA
CGGGGGTGGCGGGGGTGTTTGCGGCGAGGACGGGGGCCTTTTGCGGCGGGGACGGGGACTCACC
CTCGCCT
ATTTAACCTCCACCCACTTCAACACACACATGCCGCACAATCATGCCAGCCACAGACACAAACA
GCACCCAC
ACCACGCCGCTTCACCCAGAGTACCAACACACGTTACCCTTACACCACAGCAACACACAACCGC
CTATCAA
ACCTCGGACAAACACGCCAACGAAGAACCCGCACGCAGATGGAGCTCGACGCCGCGGATTACG
CTGCTTG
CGCGCAGGCCCCGCCAACACCTCTACGCTCAAACACAACCCCAACTACACGCATACCCCAACGCC
AACCTCA
GGAAAGCGCTCATTTTTCCACAGAAAATCAACATCAACTCACGCATCTACTTCACAACATTGGC
GAAGGCGC
AGCGCTCGGCTACCCCGTCCCCCGCGCGGAAATCCGCCGCGGCGGTGGCGACTGGGCCGACAGC
GCGAGCG
ACTTCGACGCCGACTGCTGGTGCATGTGGGGACGCTTCGGAACCATGGGCCGCCAACCTATCGT
GACCTTAC
TGTTGGCGCGCCAACGCGACGGCCTCGCTGACTGGAACGTCGTACGCTGCCGCGGCACAGGCTT
TCGCGCAC
ACGATTCCGAGGACGGCGTCTCTGTCTGGCGTCAGCACTTGGTTTTTTTTACTCGGAGGCCACGG
CCGCCGTGT
ACAGTTAGAACGTCCATCCGCGGGAGAAGCCCAAGCTCGAGGCCTATTGCCACGCATCCGGATC

ACCCCCAT
CTCCACATCTCCACGCCCAAACCAACCCAGCCCACCATATCCACCGCATCGCACCCACATGCT
ACGACTCG
CCCACATCACACGCTCTTTCCCTATCCCTTCTACACCCTCAGCCACGGTTCACAATCCCCGAAAC
TACGCCGTC
CAACTTCACGCCGAAACGACCCGCACATGGCGCTGGGCACGACGCGGTGAACGTGGCGCGTGGA
TGCCGGC
CGAGACATTTACATGTCCCAAGGATAAACGTCCCTGGTAGACGGGGTAGGGGGATCTACCAGCC
CAGGGAT
CGCGTATTTGCGCGCCACGCTGCTTCACCGATATCCAATAAACCCATCCCCTCGCCACGACGTC
TCCGCGTAT
CTTTGTAGCCTCAGGAATCCGTCCCCACGTCCATCCATCCCGAGCACTCCACACGCTATAACAG
ACCACGGA
CACGGCAAATGCATGCAAACCTTCTCATTTATTGTGTCTACTACTCTGTGTTGCTACAGGGAGTG
AAGGGGGT
GAAGGCAAAGAAAAAAAAAAGGAACAAAATAATAGATTAGCAGAAGGAATAATCCGTGCGACCG
AGCTTG
TGCTTCTTTTCTTATAAGGAGGCAAATATACTAGGGAAAACCTAAGAATAGGAAGAAACCGAGG
TTTGGA
GAAAAGCTGAGATAAAATAGCGCATTTTCCATACAGAGGTTGTTGTTTTTGTGGATCCTAAGAG
GTTTCAAG
TGCGAATCTCAAAGTTCTCACGAGAATATTGTCTTCAAGAATCGACAACGTGGTCCAAGATTT
TTTTTTGGT
CTTTTTAGGTTCTGCGAGGGACATCACGATGGATCGTTGCGATGAAGTCACGCGTACGCCTCTG
GTGTGGCG
CGGTGTCGTGACAGGAGAGTGTGTTTTTCAGTGCAGAGCTGTCTTGATTCCCTATATCCGAGTATC
TGTTTTCTC
GTAAGGACGGTAATCTTCTTTGGTGTAAGTACATCTAAAAGCTGCAAACCTATATTTTAAGGGCT
GTCTCTAG
GTGTACTTTGATGCTGGAGTTTTTCGCTGTGTTGATGTGAATAAATCTACTACTACTATTATAT
GCAGAAAGA
GTGATTATGCCGAGACAAGATTGCATTGGCTGAACTGTTTCAAAAACGCCTACACTCTACTTAT
CCGTAAAC
CTAAGGTAATACTATGTGTAAGTTGTTTTTTTTTCTTTTTGTAGTAAAATGGTGATACGTGCAA
TTAAAACTG

TATTCCATGTTTCCATCCTTTCATTTCAACTTTAAAGGCGGCTTTGAGAGCGAAGAAGTGCGAG
GATAAAAA
TGGATGACTCCTTCGTGTCCAGGGAGTCGACTACTGCAACGCTGATTGATTAAAAGATGGTCTC
CGATGATG
ATGTTGTTATTGATCGAATCATGGTGCAGAACGGCGACGGAGAGGAGCGTGTCCGCCGCCGGA
AGGTGGT
CTCTTTCTCTTTTCTTTTTTCAAGAAATCTTCCATGTGTTTATCGTAGTGATCGAAATCGACTG
ATCTCGGGTT
CTTTTTGTTGGTTTCTTTTCGGTTAATCATGTATTGTTTTCTTTTTTTACAGAAAGATACTTTT
TTCATGAGCAA
TTCCTCGCCCCGGCGCCGGCATGCCGAGGTGGGGCCACTGCGATCAGCGGCATGCCGACGCCGAC
CCGGGGA
TCTTGGAATCACCGTTTTCTCTCTTCTCTCTACATACAGACCGGGTGGCAGGAGCGGTAAGG
AATCATCGT
CGTCTTTCATTCTTCGATGATTATGGTAATACTAAATCTTATCTAGGAGCATATACATCTAAGA
TTGGAGTAC
TAGTAGTCGTTTGTGGTTTCTATTTTTTTTTATATTTATCTATGACAGTTTTTCTGTTTTTCGTT
TTGATAATAAT
ATAATAAAAACTCATGGACGTGAAATCTGGCTTGGTTGTGGTGATTTCAATTCTCATTATTGTTG
TTTTCTTTCC
GTCTTGCGGATGAAGATGTTGCGATGCGGTTGTTGTTGGTGTTGCTATACACCGAGAGAGATGA
TCTTTTTGT
TCTTCTGGTTCAATTCCTATGATTGTTTGGCTGCTGACCGACGCGTCAGGATGTGCAGGGCATG
CGGGGAATC
AGGACCGGACACGGGATAATTCATCTACCTATACGGAGATCGCGGTCCTCGCCATGAGGATCG
CGACAGG
CGCGTCGAGGGGGCAGGAACACCCTTGCGGATTGACATTCTTGGTGGTGTTTCGTTGTTGTCGG
TAGTTGTTG
TTGACGATGAGGATAAATAAAAATGACCTTGTTTTGTCTGTTTTCTCTTGTGGGAATCGTC
GACTTTGAA
TTCTTCGAGTTATCGGAAAGCTGAGGTACCCAAATGTCTGTAGCTTTTTTCTTTTTTACCCTCTT
GTTTATCATC
TGCGATTCTGTGGTAGGTAGGAGAGGGAAATGATAATCCGAGATTAAGGAAAGGAGAAGATAAAA
AATAAA
AAAAAAATAATAAAACAGAAGCCGACCGGCCCGACCCGTTCCCCAGGACCAGCCTACGAGGA

ATGGATA
ACGCGGTGGCGACGGCAGCGGTGGTGGCGCTGGGGGTGGCGGCAGTGGTACTGCTGATGGTAGT
CGGGACG
GAGGAGAGGCGATGCATACATACACGCGTGCATGCTGCATGGGTGGATGGTACGGCCGGGAGAC
GCGGAA
GAGAACTCACATAAAAAGGTGACAAAAAGAGCGGTTGAAAAAGAAAACGAGATTCGACCAGA
CAGAAG
AGAAGGACCGGGGCTTGGCGACCCTTCCACGACTGCTGTTGTCATCTCGGCTCCCCGTCTTCT
CCCGGCCAC
GGGCGGCTAAGTCACCGCCGTTCTCCCCATCCGTCCGAGCGCCGACCGACCAGCCGGCCGATTC
GCCCCCGG
GGGCTTCTGGAGAACGCCGGGGCAGCAGCGATCTGGGGAAGCCGCTAAACCCCTGCGTTTTTAT
ATGGTAGC
TCTGCCGAGCGCGGGCTGACGCGTTGAGTAAGCGGAAAGACGTGTGTGACGAAAAGGGGTCCCA
TGGTATT
TCACGTGACGATGAGGAGATGCGGTTTGGAGCACATACGGTTTAGAAAAAGGGAGTTGTCGTGA
CAAGGGC
TGAGGGACCTCTGTCTCCATGTGTGTATAAAAAGCAAGGCACGTTCATAATGTAAAAAAGAACA
CGTTGTAA
ACAAGCTATTGCTGTATCATTGCGCTGACTATGCTTCATTGCGACTGATTTTCTTTTCCTAACG
GCGTAACTT
AAAGTGATTAACGTATGATATTTGTTCCCCAGAGTTATACTATAGTCATCATCCTAAAATTCAG
ATATAAATG
AACACATGTCGTATGGGATTATTAAGAAACCGAAACTCTCCACAGTTCACCATCTTCTTCGTCA
TTCAACCG
ATGACCCACTCCGTACAACGAATCAGTCTGCTGTGTCACACTGCAAACCTACTAGCGACGTATGC
AAACAACCT
TGAAACACGGGCTGTTGTATTGACGACCGTTGTACCATTACTAGTCACATTGCATAGAGACCAT
CCACCGTC
ATCCCATCTTTCCACCCGATGGAAAACCGTCTTCTATCATCAACTATGGTAAGATTTTCGACCC
TGCGAGGTA
TTCAGTTTCCCCATATCCATAACCTGGATTTTATCATTAACCCCAATATTAACACTTTTTTA
GTACCCCCC
ACCCACCAAAAAATGTGACTGGACCGGTTCCTAGCAGCTCTGGGAGCCATGTTTCAGGTTGAACC
ACAGCTAC

AGCGAAACCGAGTCCAGTGACCGGTAACCACGTCCAGCCCCTGCGTATGTACCAGTCCAAGCAC
GTCCGGTC
ATTGTTCTACACAGGAAATCTAACTAGGTCAACGCAATTTTATTCCACCGTTACGCAGAATACT
AACAAACA
AACACACAAATTTAACGAATTACACGTAGTTTATTACATGAAAACGTGAAGAACACCAATTCAC
TAAGCGAT
ACAACATTTAGCTGACTTCCAAGTGCCACACATCACCCTGTATTCATCCATGTTTTACCGAA
CCAACGAG
ACAGATCGAAGAAGCCAGAATCTCCCGACTTTAAATTACATAAATCCAACGTATTATGACCACA
GCTCGACA
CACAAATAGTTGCGTTACTATTACAGTAGCATTACCTATACCCGTAACGTTGCACAACCACTG
ATCACCATT
GTTACCAAAAACGGTTTTTCCACTTAGTTGTCAACGGATCTTTCCCATGCGTAATGGTCAAATTA
CTACCAGTC
GTCGCTTTTAGCTCATTACGAGTATTATCCGCATCCACATATATCAACGTCATAGCTAGGCACG
CTATAAGTA
CCCCCCCCCACAATGGAATGTTGCCAAACCGGTTCTTTCCCGTTATAGCCATAGCGTTCCCAG
GCAAAAGC
AAACGCCAAACCTAATGCAGTGAAAAGCGCTTGCAGCCAGAACCAGCTTATGTACCAGCCACAA
TCACATC
CGGTTATTGTTTCCACAGGAAATCCTACCAGGCAAAGCCCCGCTTGTTTTGTTCTGACCATCT
TGTTTAGCA
ATTTCGTAAACTGTCAGCCTAGCGACGTCCGTTTAGATCAAAAGTCACGTATATAGCGACGCTGT
TTCCACCC
GTTTCCCCGTCCCGCCGTTTCCGAACAACCCACCCGGGTTTCAGACAACCGACCACCAACAGAAA
TATACACA
CAGACCACCGGGAGTTCAGTTAAAGATTTTCATCAGGTTTATTTTGGCTGCTGCTAGTCTTTTGC
TTCTTAGAA
AAAAAATACCCATATAGAGAAATAATGATAGTTTGACAACACATATGGCAGGGATTTCTTCTTC
ATCAATAA
GATATGCAATTCCCCCAGGGAGAGACTTTCAACAATTGAATTTACAAAAACAAAATTACATCAG
GAGAAAG
AGAGGATACATTAATAAATATATTATATCTGGTGTATATACTGAATGCTGCTGGTTCATAAGGT
AACGATGC
TACTTTTTTTAATTCCAAGATGGTTTTTCTTTGTTAGTCTTTTGTTGACTTGCTGGTTCCTAAA

AGTTCGCAAA
AACGATTGTGTGAAGATTATGACGTTGGTTGACTAGTTCATGAGATTCTGCTGTACGTGTGATG
GTTATTTCGC
TGGTTCGTTCTAAGATGAGTATCGTACTGTGTCTGCGATGGTCGTCTCTTACTGGCATTCTCTC
GGCTGCCTCT
TGTTTTTCATGATTGAAAAGGAAAAAAGGACTCCGAGGGCGCGGTCATCTTTTACTTTTCGGTTT
TCTCGTTGG
CGGGTCAGAGGTAGTCAGATCATGAGACTGTCGTGGTCGATGAAACTGTGTCTGCTCAAGTGAC
GTCCATTT
CTTGTACGGAGAAAAAAGTCATCGGGATAAATAAGGCTATACAAGGCGTTGTCAAGCGTGCGGC
TCTAAAC
AAATTAAGCGATACAAAATTACAGTGATACGAATAATAAATTACCCCCTCCCCCTGTGGTCCCC
CCGAGGCG
AGAGCCACCCATCGTGTACTCTCGCACCCACGACCACAGGGGGAGACGGGACGAAGAGACG
ACGCAG
AGCGCCATCTCCTCCTGGAGGCCGGCGGCGTTAACTGCTACAGCTGCGGCGGCGACGACAGCTG
CGATTTGT
CGGCCGACATGCCGATGGTATGGGCGGCGGCGGCGGTGGCCGCGGCAGCGGGGAGGAGAGGAGA
GAGAAG
AGGAGCGGGGCGTCCGAAGGCGAGGATGGCATGGTCTCGCCGGAGCGCCCGGCTTTTATGGAAC
ACTCGCG
TCCGGTTGGGTATCACCCACAGGAAGATGAATCACAACCTTCAAACCATCTTGAGACCCGAGTA
ACGGTTTA
CAGGTCGCACGCCAGTCTCAGCTAAAAACAGCGGACAGTCCCACGCTGTTTCTGTTGTGGCTCT
CTCCAGTTT
CCTCATCGCCGTCTTGGTCTCCGTTCATCATCGGAAGAATACCACCCGCTCTCATGCGGCAGTCG
ATCAGCCTC
GATGAACGAGACGCGGCGACGCCTTTCTACGGCCGACTGGTTGTGGTGGTGAAAGAAGAGCACC
AGCAATC
CCAGGAGGAGCAACAAGCCCTCACATGTCCAGGAGGTCGGGGAGAGGGCCTGTCCGAGATGACC
GTGAGG
CATCACGTACGGCAGCTGAGGAGAAACGGAGAAGAAAGGAAAATTACCGTCAGGGGCCGGGGTT
CTTATTA
GAGAAACAGCACGTAGGTCAGGATCCAGATGCTAATGGCAATCATGATGACGATGATCATGCAG
GCCAAGA

CGCGGCGCACCAATGCAGAATCCAATAGCCGCCGTGCCTCCGGTTGGTGGCCGGCGGCATCTAG
AGACATG
ATTTGGGGGGGGGACCGGCGGCGCAAAAAGACAGGGAGATGGACAGTGCCACGGTGTTTTGTTA
TGATTAG
GACATGGGGACCGGAAGCCGAGACAGAGTACTACAGGGTGTTGAAGGGTAACGTGAGGGAGATC
ATGTCAT
GGGCGGGCTGAAGACCGTGCGGGGAGGATCGACGTGTGCGGTGCTTGTGGAACACGGTGTTTTA
ATATGTA
TCCGCGTGTAATGCACGCGGTGTGCTTTTTAGCACTCGGCTTGATAAGCTACGTGACCGTCTGC
GCTGAAAC
CATGGTCGCCACCAACTGTCTCGTGAAAACAGAAAATACCCACCTAGCATGTAAGTGCAATCCG
AATAGTAC
ATCTACCAATGGCAGCAAGTGCCACGCGATGTGCAAATGCCGGGTCACAGAACCCATTACCATG
CTAGGCG
CATACTCGGCCTGGGGCGCGGGCTCGTTTCGTGGCCACGCTGATAGTCCTGCTGGTGGTCTTCTT
CGTAATTTA
CGCGCGCGAGGAGGAGAAAAACAACACGGGCACCGAGGTAGATCAATGTCTGGCCTATCGGAGC
CTGACAC
GCAAAAAGCTGGAACAACACGCGGCTAAAAAGCAGAACATCTACGAACGGATTCCATACCGACC
CTCCAGA
CAGAAAGATAACTCCCCGTTGATCGAACCGACGGGCACAGACGACGAAGAGGACGAGGACGACG
ACGTTT
AACGAGGAAGACGAGAACGTGTTTTGCACCATGCAGACCTACAGCAACTCCCTCACGCTTGTC
TAGTCACG
TCGCTGTTTTTATTACAGCTCAGGGAAGTTTATCGAATGCCGTGCAACCAATCAAAAACCCC
TAAAGCTC
GCCAACTACCGCGCCACTTGCGAAAACCGTACACGCACGCTGGTTACCAGGCTTAACACTAGCC
ATCACAGC
GTAGTCTGGCAACGTTATGATATCTACAGCAGATACATGCGTCGTATGCCGCCACTTTGCATCA
TTACAGAC
GCCTATAAAGAAACCACGCGTCAGGGTGGCGCAACTTTCACGTGCACGCGCCAAAATCTCACGC
TGTACAAT
CTTACGGTTAAAGATACGGGAGTCTACCTTCTACAGGATCAGTATACCGGCGATGTCGAAGCTT
TCTACCTC
ATCATCCACCCACGCAGCTTCTGCCGAGCCTTGGAACGCGTCGATGCTTTTATCCGGGACCAG

GCAGAGTC
GGTGTGGTCACGGATTCCCAAGAGGCAGACCGAGCAATTATCTCGGATTTAAAACGCCAGTGGT
CCGGCCTC
TCACTCCATTGCGCCTGGGTTTCGGGACTGATGATCTTTGTTGGCGCACTGGTCATCTGCTTTC
TGCGATCGC
AACGAATCGGAGAACAGGACGTTGAACATCTGCGGACGGACCTGGATACGGAACCTTTGTTGTT
GACGGTG
GACGGGAATTTGGAATAAAAGATGCGTAACACCTGTCGAAGATGCGATAACTTTACATACAGGC
AAACAGT
GTATACAATTATAGTATTTTGTATGTTGCATAAAGTTACATGCAACAGTACTGCTAACAGTACT
GCATCCATT
ACGCTATCCAACACTGCCTCTACCACTTTTGTAACCAACATATATTCAACTCCGAATAACAACA
CATCAACG
ACGCCACACACATCTGTCACCTCACAAGCGTCAACCATTGGCAACATCACCAACGTTACCTCCG
ACTTGAGT
ACTTTCACAACCGTATATTCTACATTCAATACATCATTTGCCAATATATCTAATACGGCTGTCA
CTACAGAAT
TGATTTCAACAAATACCAACACTATCTCATCTTTTACCAACGTAACAGCAAACGCTACATCATC
TTATAACAC
AACAATCACCGTAACTGTCACGTCAGATGAACTTCGCACAACGTATCCACTAATAATGCACTT
ATAAGCAC
ACCATGGCCTACAAATTGCAGCGCCACAACATACACCACGTACAACCTTACTAACTCTTCCAAC
GCTTGTC
CACAGAGACAACAATCATACGTTTCAAGGAAACCAATACAACAGGAATAGAAGGGAGTAATGTC
ACCATAA
AGGGTAATTCTACGTGGGACTGTCTTTCAGTCGCCTGGATACGACATTACAATAGATCCACACA
CGGACATC
ATCTAGGTTATCGTAAGAACGCACATACCCAATCTTGGTATTGGCTACGCATCCTTACCTCTCA
CACTGTATG
TCATTCTCAACATGAAAGACCTTCACTGTACCATGACTTATGTCGTTTCGTGCAACAACACAGAA
TTACATCTG
TACGATCTAAATATCACCAATTCCGGCAGGTACAGCAGACGTTGTTTTAAAGAAAATTACTTCA
CAGGACAT
CACGAAGATGAAAATTTCTACCTATTAGTAACACCAAAAAATCATACTGAAGCTATTAATGCTA
CTTTCGTT

TGCCCTAGATACAACACCGATATCGAAAATGAAGATAGAGAGAAAGGAAGTCAACATACTAACA
ATACACA
TCACCACAAACGTAATCTCTATCATAGCTCGCAAAGAAGCCGCACCGTATGGACCATCGTGTTG
GTTTGTAT
GGCCTGCATAGTTCTGTTTTTTGCACGACGAGCCTTTAACAAAAAGTATCATATGTTACAAGAC
ACCGTCAG
TGAATCAGAATTCATTGTTTCGATATCACCCAGAACATGAAGATTGAGCTACGTTTCCGGGCAGA
CATCTTAT
GAAGCTGAACAATAAACTAAACATTCTGTAAGACTCAGCGTTCAAAGGAATATTAATGCCCAT
TGAGCGA
AAACTAATATTGCAATGGACTGGCGATTTACGGTTACGTGGACCGTTACTTGTGATGGTTTCAA
TTATACAGT
CCATAAAAGATGCGATCGCAGTTACGAGGTAATCAACGTAACAGGATACGTTGGTAGCAACATA
ACTCTAA
AAAAATGCAATCAGACTGAGAAATGGCACAATGTAGACTGGATTTCATTATGAGTACCCACGCA
TAAAATG
TGCGAATTAGGCAACTATCACCAAACACACCACGGCACGACATATGTTTTGACTGCAACGACA
CCTCCCTA
ACTATCTACAACCTAACCACAAAAAACGCTGGAAAATATACCAGGCGTCACCGTGATAACGGTC
AAGAAGA
AAATTACTACGTAACGGTGTTAATTGGAGACACAACGTTATTCACTCTTGGCACATGCCCTGTA
AGATATAA
AGAATCTACGAACACTGAAAACACCATTGGAAGTAGCATCATAGAAACCATTGAGAAAGCTAAC
ATTCCCC
TGGAATTCATGCTGTATGGGCAGGCGTAGTGGTATCAGTGGCGCTTATAGCGTTGTACATGGG
TAGCCATC
GCATTCCCAAAAAGCCGCATTACACCAAACCTCCCAAATATGATCCAGATGAATTTTGGACTAA
GGCTTAAC
ATGCTGATCAATAAACTTTTTTTAACCAATAACATGTCTCCGTTTTTTTTTGTTAACAACCTAT
GATATAAAG
CGTTATATTCAGTCGTTACTAAACAAAAAACATGGGCATGCAATGCAACACTAAATTGTTATT
GCCAGTCG
CACTAATACCGGTTGCAATCATCCTAATTGGTACTCTAGTGCCGATACTTTTACATGAACAAAA
AAAGGCGT
TTTACTGGCGACTTTTTCTGCAAAGTCAACATGTAGAAGCACCCATTACAGTAACGCAGGGAGA

CACAGTCT
ACCTAGACGCTAGCAATAATCCCTGTAATTATTCAGCTTTTGGTACCACGGTAATTGCGAACT
TTGTGGATG
GAACGGATATCTACGCAATGTTACACATTACTACACAAACACATCGTGTTCCCCGCAATTCATC
TGCATAAA
CGAAACTAAAGGTCTGCAGTTATATAATGTAACATTAAACGATTCAGGCGCTTATACTGAACAC
GTTTACGA
ATGTGACCTTTCGTGTAACATTACTACTAATAACGAATATGAAATACTCAATTATTTTGATAAC
TGTAACTAC
ACCATAAATAGCACCAAGCATATTATCACCGTGGTGTCTTCACGTCATTCTAAACAAACAAATT
CCCACGTA
TCCACTCACGCTGGTTGGGCAGTCGCCGTGGTGACGGTAATTATGATCTACGTTCTGATCCACT
TTAACGTCC
CGGCAACTCTGAGACACAACTACGAACTAGAAACAACGTAAATCGCATAGCGTGATTATAAAG
TATCGAC
GCTAATTTCTCCAAGATAAAATTTGATTACTCCGTGCAGTTCTCAAAAACGTAAAGCCCCGCT
TTTCCACTC
CGTCATGAAGGATCGCAATAGAATACTGCTATGTATCATCTTTATTTGCATTATGTGCCTCATT
TGTATTTAC
TTTAAACGTCGTTGTGTTTTTACTCCGTCTCCAGACAAAGCAGATCTGCGAGTGGAATTTCCCT
CGTTACCCC
CGTGTATTGGCATAACAGTGCGCTGCATGAGAACACGCGTGACACATAGCGTACCCCTGGACGGT
ACAGTTTA
TGATAACGTAATTCAGGGAAAGTATACATTCATACCAACATGTTATCACATAACACACAGATTT
TCTGCGTG
TTTTATAAAAGAGCGTCTCGAAGCAGCTTGAGCCACACTACGGTCCAGATGACGAGCGTAATTA
AAAATATG
CCGCGCAGTATTCGAAAGCCGTACTGAGCGTGCGAGGCGGGTAGGGTGCCGAACGACGGATATG
CGTCGTT
GTCATCTTCGACTATAAGGATCGCGACCGAGTCTTCGGCCATGGTAAACGTCACCCTGTGTGGC
TGGTATGT
AGCGTATCCGTTTGGGAATTGTTCTGCTCCAGCTCGGGGGATAGTGAGGAATTCTCAAGGGATA
CGGGACCC
AATGACTGGATAAGAGAAGGGTTTTTCCCCGTAAGATGATCCTCGTATCACATGAGGTCTGGAT
ATGTATAA

ATGAAGAGTGAAATAGGCACAGGGAATCAGATGCCAGCCTCGTGATGCAGCCGCTGGTTCTCTC
GGCGAAG
AAACTGTCGTCTTTGCTGACTTGCAAATACATCCCGCCTTAAGCGATGAGTCTATAAAGCACCG
TTGCCCCGA
GTACGGTAAAAGTGACCCGGATTGTAGAACGTCCTTTTTTTTTGTTTTTGCATCGTTTATCGTC
ACTACTAGT
GCAATATTTTGATTGTAAGGCTGAAAGAGTATCGTTATGATGCTTAGAACGTGGAGATTATTAC
AGATGGTA
CTGCTTGCCGCGTACTGTTATTATGTTTTTGCGACTTGTTCAATCAGCACGACGACTGCTCCTG
TGGAATGGA
AGTCTCCCGACCGTCAGATTCCCAAGAATATTACCTGCGCTAATTACTCAGGGACCGTCAACGG
CAACGTTA
GTTTCGTTCTTCCCGAAACTCCAGGGTAACTATGACGAACAACATTACAGATATGAAGTAGCGAA
CCTGACGT
ATAACTGCACCTATAACCGCTTGACGTTGCTGAATCTGACGACGGAAAACAGCGGAAAGTACTA
TTTCAAAA
GGGAAGATGCGAATTTACCTTCTATTACTCTTGTTACAACCTTGACCGTGTCTAAAGATCGCA
CGTGAAGTT
TCACAGAGCCGCGTGGCTGTAGCTATTGTGTTTACGTTGCTTTTGAAATGTTAAGCGTCCCTAC
GGCGCTAAC
ATGTTTCTAGGCTACTCTGACTGTGTAGATCCCGGCCTTGCTGTGTATCGTGTATCTAGATCAC
GCTTAAAGC
TCATGTTGTCTTTTGTGTGGTTGGTCGGTTTGCGTTTCTATGATTGTGCCGCGTTCGAGTCCTG
CTGTTACGAC
ATCACCGAGGCGGAGAGTAACAAGGCTATATCAAGGGACGAAGCAGCATTACCTCCAGCGTGA
GCACCCG
TACACCGTCCCTGGCGATCGCGCCTCCTCCTGACCGATCGATGCTGTTGTGCGGAGAGGAAGAA
CTCGTTCC
GTGGAGTCGTCTCATCATCACTAAGCAGTTCTACGGAGGCCTGATTTTCCACACCACCTGGGTC
ACCGGCTTC
GTCCTGCTAGGACTCTTGACGCTTTTCGCCAGCCTGTTTCGCGTACCGCAATCCATCTGTCGTT
TCTGCATAG
ACCGTCTCCGGGACATCGCCCGTCCTCTGAAATACCGCTATCAACGTCTTGTCGCTACCGTGTA
GCTAGTTAG
CCAGCTGTGTGTAGTGTTTTGCTTTTGCATATTTGTTTTTCAGTCAGAGAGTCTGAAACGGGGTG

GGAGGGACT
TTTGCGGGTAGTGCATGCTAAGATGAACGGGTGGGCTGGGGTGTGCTTGATAACTCACTGTTTG
AATACGCG
CTCACGCACATATGTAGCACTCAACATGTTAGCTTTTGCCCGCACGCCCCGGGGCGTGCCGAGC
TGCCTTTTT
AATAAAGTCTGGGTTTCCAGATACGCGCTGGTTCTGATTTTGATGGTTTGTGCCTCTGAAAGCT
CTACGAGCT
GGGCCGTGACATCCAATGGACTGCCTAACTGTAGCACGGTAACTAGAACAGCGGGTCAAGACGC
TGAATTG
CACGGTCCGGCACCGTTAAGCTGTAATGTGACCCAGTGGGGACGTTACGAGAATGGAAGCACAC
CCGTGTT
ATGGTGCACTTTACGGGGATCAAGCATGCGAGTCTCATTAGGACACCGTG TAGCGTTTGGCTGT
TCTTGAA
AACATTTTTTATTTATAACGTTTCTGAAAGTAGCGGTGGCACTTACTATCAAAAAGGTTACAAC
TGCACCGA
CAAACATATAACACTATCTTGTTTCAACTTAACGGTGGTTCCTCGAGCGGTTCAAAGCACAAACC
ACCGTAAT
GACACCCACGCTGGTTACAACTCCACATT CAGTGTGTCAC TTGTTCCGTTGAGACTGACGACA
AATTCCAG
CGCGTTTGGACACGCTATTTATCAACGACAACAGCGTGTTGAAAACGGGACGTTATCCAAGAAC
ATAACTAA
CTTGGCATTACCTATGGCAGCTGGGGCGTTGCGATGCTGCTGTTTGCCGCCGTGATGGTGCTC
GTTGATTTG
GGTTTGCCTCAATCGGCTTGGCGACGCTGGCGAAGCCACGTGGACGATGAAGAACGTGGTTTGT
TAATGTAG
GAAATAAAAGGCAGTTTGAGCATGACTGTTTCCAAACCGTAACGTGGTAAATAAATCATGGCTT
CCGACGTG
GGTCTCATCCTCTGACGGTTACACGATTTGCTGCAGAGTGCATTATGTGTACAATAAACTGT
TGATTTTAA
CTTTGTTTGCCCCCGTGATTCTGGAATCCGTCATCTACGTGTCCGGGCCACAGGGAGGGAACGT
TACCCTGGT
ATCCAAC TTCAC TTCAAACATCAGCGCACGGTGGTTCCGCTGGGACGGCAACGATAGCCATCTC
ATTTGCTT
TTACAAACGTGGAGAGGGTCTTTCTACGCCCTATGTGGGTTTAAAGCCTAAGTTGTGCGGCTAAC
CAAATCAC

CATCTTCAACCTCACGTTGAACGACTCCGGTCGTTACGGAGCAGAAGGTTTTACGAGAAGCGGC
GAAAATG
AAACGTTCTGTGGTATAATTTGACCGTGAAACCCAAACCTTTGGAACTACTCCAGCTAGTAA
CGTAACAA
CCATCGTCACGACGACATCGACGATGATCGACGCGAAAAGTAACGTTACAGGGAACGCCAGTTT
AGCACCA
CAATTACGTGCCGTCGCTGGATTCTCCAATCAGACGCCTTTGGAAAACAACACGCACCTGGCCT
TGGTAGGT
GTTGTTGTGTTTTTAGTTCTGATAGTTGTTTGCATTATGGGGTGGTGGAAATTGTTGTGTGGTA
AACCAGAGT
TATAGTAATGTGCTTTTTATCAGGGAGAAGGTTTTGTGCCAACAATGACTAGCCCGGGACTATC
TGCGTCAG
AAAATTATGACGGAAATTATGAATTCACGGAAACCGCCAATACAACGCGTACAAATAGAAGTGA
CTGGACA
ACGTTAGAAACCAGTGCATTGCTATTGAAAAACACGGAGACTGCAGTGAACCTCAGCAACGCGA
CTACGGT
CATCCCACAACCTGTAGAATACCCGGCTGGGGAAGTACAATATCAAAGAACGGCAACGCATTAT
TCTTGGAT
GCTAATCATTGTCATCATTCTCATCATTTTTATTATCATCTGTCTACGAGCACCTCGAAAAATC
TACCATCACT
GGAAAGACAGTAAACAGTACGGACAAGTGTTTATGACAGACACGGAAGTGTGACAGTGATGTCT
AAGCGTT
TGCAGGTATTTCCATGGATAACAATTTTATTTTACACATCAAATCCCAGTATTGGAAGTATAT
GGCAATACC
ATGTACCCCTACAGTTGGATACGGCAGTCATAATATTAGCTTGCATCCGCTTAATAACTCATTA
TTTCAAGAC
GATGTTTTTTGAATGGTACATAGACAAACCAATGGTTACAAGTTATGTCTTTATCAAAGTAATGA
ACGCACAA
AATCCAATCTAGACTCTCCAAATATTGTGTGGCAATGCACAGATAATCGTACACTAATTCTCAT
GAACTTAA
CCACAACATACAGTAGAACTATTATTTTCAATCCTTTAAATATCTCGGACGAGGAGTACCAAA
ACCGAATA
ACTTGTGTTATAACGTTAGTGTACACTTTACCCACCAAACACATTGCCATACAACTACATCATC
CCTGTATCC
ACCTACATCTGTACACGATTCATTAGAAATATCACAGTCATTCACCTCAACCAACTTCACACAT

ACCGCGGT
CCACTACGCCACCGGTAACGTTGAAGCACAACACGACACTACCACTCCACATACAATGTGGATC
ATACCCCT
AGTTATCGTTATAACAATCATCGTTTTAACTTGTTTCAAATCCCCCAGAAAGCTTGAATAAA
TTCACACAA
TACAGATACAGCGGTATGCTCGCCGCCGCTTAAAGAATCAACGCCAAGGAAACCAAAACGTAAA
AAGAATA
GATATGTACGTTTATTTTTTCAGCTCACTGTTTGAATACCGTAAACATAATGACGTACATATACG
TGGTTATAC
AACAGGTGTTTGTGTTATGCGGCGACTGATTAACCATATCGTGAACCATGATCTTTTCCGATGG
TCCGTCGTG
ACCGCAATGATATTTTACAGATATTCCGAAACCTGTATGGAGGTCCTGTCAGAGTAGGTGATC
CAGTTACC
CTCGGTAGTGGACATGGTTATCATCCAGGTAGGGATAACAGGGTAATGATCCTCTAGAGTCGAC
CTGCAGGC
ATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGTCTCACCTAAATAGCTTGG

SEQ ID NO: 11

ДНК

Род/вид – цитомегаловирус ЦМВЧ

Описательное название – пост-редактирование фрагмента ЦМВЧ

ACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGATTAC
CCTGTTAT
CCCTACCATTCCGGGCCGTGTGCTGGGTCCCCGAGGGCGGGGGGGTGTTTTTAGCGGGGGGGT
GAAATTTG
GAGTCTTGGAGCCGCGTGTGCTGTGGAGGACGGTGACGGTGGTAAGAGTGTGCTGCGGTGCGGT
TGGGACG
GCGGCGGCGAATAAAAGCGGCGTGCGGCGCGCACGGCGAAAAGCAGACGCGCGTCTGTGTTGTG
TGTCTTT
GACCGCGGCGGAACACACGCGGAAAAGCGAGTCCCAGGGGACACACGACGAGCGAGTCCCAGGG
GGGGAC
GACGACGGCCAGGGACGCGGAAACGACGCGGAAAAGAGGAAGTCCCCAGGGGGACGGGCGGAAA
AGAGG
AAGCGCCTAGGGGACCGCGGGGGCAGGAACAGACGAAGTACGCCGCAACCCGCGTCGAGGACAC
ACGCAG
AAGCGGCCGCCAGGGGAGGGGGGGGGGGGGGACTCGCGGGCCCCGGGGCACACTTGTTGTTCCC

TCCGGCC
GCCGACACGCACCCCGAAGCCGCGCACACCGCCGACACACCCCTGACACACCCGCGACACACCC
GCCACAC
GCCCCGACACACGCCCCGCGACACACCCGACCGACACACCCCTGACACACCCCGCCAACACACCCAG
CCGCACC
CGCCCCGCCAACACACCCCCGACACACCCGACACACGCCCCGCGACACACCCGGCACACACCCAC
CCACCCA
GCCGCGCCCCCGACACACCCCGAACGGCGCCGGTGCGGGACAGGGCTCACGGAGGTTTGCGGGC
CGTGAGC
ACGCCTCCCTTTGTACACACTACCGGTGCGTGCGTCCACGCTATTTGTTGCGGAGACCGGAC
TAAGGGAG
GTTTGCGGTGCGTCAGCGCGGGGCGGCGTTTGCGGCGTGTTTCGACCAGCGCTTTGTGCGCGCT
GCCTGTGC
GTGTCGTCCCATGGTCTTTGTCAGCGGCACGGCGCTGGGGACGGGGTTTCACCGCGCTGAGGGA
TCTTTCTG
CGGGTGTGAGGGACGGAGCTTTTTTCGCACGCTGGGCACCGGGCTGGGGGACGGGGGGTGTCG
GGACGGC
GGTGGGGCCGGGGCGTTGCGGGTACGGGGATTACGCTGGGAACGGGGACTCGCGGACCCGGGCT
GAGGGA
CGGGGGTGCGGGGGTGTTTGCGGCGAGGACGGGGGCCTTTTGCGGCGGGGACGGGGACTCACC
CTCGCCT
ATTTAACCTCCACCCACTTCAACACACACATGCCGCACAATCATGCCAGCCACAGACACAAACA
GCACCCAC
ACCACGCCGCTTCACCCAGAGTACCAACACACGTTACCCTTACACCACAGCAACACACAACCGC
CTATCCAA
ACCTCGGACAAACACGCCAACGAAGAACACCGCACGCAGATGGAGCTCGACGCCGCGGATTACG
CTGCTTG
CGCGCAGGCCCCGCCAACACCTCTACGCTCAAACACAACCCCAACTACACGCATACCCCAACGCC
AACCCTCA
GGAAAGCGCTCATTTTTCCACAGAAAATCAACATCAACTCACGCATCTACTTCACAACATTGGC
GAAGGCGC
AGCGCTCGGCTACCCCGTCCCCCGCGCGGAAATCCGCCGCGGCGGTGGCGACTGGGCCGACAGC
GCGAGCG
ACTTCGACGCCGACTGCTGGTGATGTGGGGACGCTTCGGAACCATGGGCCGCCAACCTATCGT
GACCTTAC

TGTTGGCGCGCCAACGCGACGGCCTCGCTGACTGGAACGTCGTACGCTGCCGCGGCACAGGCTT
TCGCGCAC
ACGATTCCGAGGACGGCGTCTCTGTCTGGCGTCAGCACTTGGTTTTTTTTACTCGGAGGCCACGG
CCGCCGTGT
ACAGTTAGAACGTCCATCCGCGGGAGAAGCCCAAGCTCGAGGCCTATTGCCACGCATCCGGATC
ACCCCCAT
CTCCACATCTCCACGCCCCAAAACCACCCCAGCCCACCATATCCACCGCATCGCACCCACATGCT
ACGACTCG
CCCACATCACACGCTCTTTCCTATCCCTTCTACACCCTCAGCCACGGTTCACAATCCCCGAAAC
TACGCCGTC
CAACTTCACGCCGAAACGACCCGCACATGGCGCTGGGCACGACGCGGTGAACGTGGCGCGTGGA
TGCCGGC
CGAGACATTTACATGTCCCAAGGATAAACGTCCCTGGTAGACGGGGTAGGGGGATCTACCAGCC
CAGGGAT
CGCGTATTTGCGCGCCACGCTGCTTCACCGATATCCAATAAACCCATCCCCTCGCCACGACGTC
TCCGCGTAT
CTTTGTAGCCTCAGGAATCCGTCCCCACGTCCATCCATCCCGAGCACTCCACACGCTATAACAG
ACCACGGA
CACGGCAAATGCATGCAAACCTCTCATTTATTGTGTCTACTACTCTGTGTTGCTACAGGGAGTG
AAGGGGGT
GAAGGCAAAGAAAAAAAAAAGGAACAAAATAATAGATTAGCAGAAGGAATAATCCGTGCGACCG
AGCTTG
TGCTTCTTTTCTTATAAGGAGGCAAATATACTAGGGAAAACCTAAGAATAGGAAGAAACCGAGG
TTTGGA
GAAAAGCTGAGATAAAATAGCGCATTTTCCATACAGAGGTTGTTGTTTTTGTGGATCCTAAGAG
GTTTCAAG
TGCGAATCTCAAAGTTCTCACGAGAATATTGTCTTCAAGAATCGACAACGTGGTCCAAGATTT
TTTTTTGGT
CTTTTTAGGTTCTGCGAGGGACATCACGATGGATCGTTGCGATGAAGTCACGCGTACGCCTCTG
GTGTGGCG
CGGTGTCGTGACAGGAGAGTGTGTTTTTCAGTGCAGAGCTGTCTTGATTCTATATCCGAGTATC
TGTTTTCTC
GTAAGGACGGTAATCTTCTTTGGTGTAAGTACATCTAAAAGCTGCAAACCTATATTTTAAGGGCT
GTCTCTAG
GTGTACTTTGATGCTGGAGTTTTTCCrCTGTGTTGATGTGAATAAATCTACTACTATTATA

TGCAGAAAGA
GTGATTATGCCGAGACAAGATTGCATTGGCTGAACTGTTTCAAAAACGCCTACACTCTACTTAT
CCGTAAAC
CTAAGGTAATACTATGTGTAAGTTGTTTTTTTTCTTTTTGTAGTAAAATGGTGATACGTGCAA
TTAAAACTG
TATTCCATGTTTCCATCCTTTCATTTCAACTTTAAAGGCGGCTTTGAGAGCGAAGAAGTGCGAG
GATAAAAA
TGGATGACTCCTTCGTGTCCAGGGAGTCGACTACTGCAACGCTGATTGATTAAAAGATGGTCTC
CGATGATG
ATGTTGTTATTGATCGAATCATGGTGCAGAACGGCGACGGAGAGGAGCGTGTCCGCCGCCGGA
AGGTGGT
CTCTTCTCTTTCTTTTTTCAAGAAATCTTCCATGTGTTTATCGTAGTGATCGAAATCGACTG
ATCTCGGGTT
CTTTTTGTTGGTTTCTTTTCGGTTAATCATGTATTGTTTTCTTTTTTTACAGAAAGATACTTTT
TTCATGAGCAA
TTCCTCGCCCCGGCGCCGGCATGCCGAGGTGGGGCCACTGCGATCAGCGGCATGCCGACGCCGAC
CCGGGGA
TCTTGATTACCGTTTTCTCTCTTCTCTCTACATACAGACCGGGTGGCAGGAGCGGTAAGG
AATCATCGT
CGTCTTTCATTCTTCGATGATTATGGTAATACTAAATCTTATCTAGGAGCATATACATCTAAGA
TTGGAGTAC
TAGTAGTCGTTTGTGGTTTCTATTTTTTTTATATTTATCTATGACAGTTTTTCTGTTTTTCGTT
TTGATAATAAT
ATAATAAAAACTCATGGACCrTGAAATCTCrCrCTTGGTTGTGGTGATTTTCATTCTCATTATTG
TTCrTTTTCTTTCC
GTCTTGCGGATGAAGATGTTGCGATGCGGTTGTTGTTGGTGTGCTATACACCGAGAGAGATGA
TCTTTTTGT
TCTTCTGGTTCATTTCCATGATTGTTTGGCTGCTGACCGACGCGTCAGGATGTGCAGGGCATG
CGGGGAATC
AGGACCGGACACGGGATAATTTTCATCTACCTATACGGAGATCGCGGTCCTCGCCATGAGGATCG
CGACAGG
CGCGTCGAGGGGGCAGGAACACCCTTGCGGATTGACATTCTTGGTGGTGTTCGTTGTTGTCGG
TAGTTGTTG
TTGACGATGAGGATAAATAAAAATGACCTTGTTTTGTCTGTTTTCTCTTGTGGGAATCGTC
GACTTTGAA

TTCTTCGAGTTATCGGAAAGCTGAGGTACCCAAATGTCTGTAGCTTTTTTCTTTTACCCTCTT
GTTTATCATC
TGCGATTCTGTGGTAGGTAGGAGAGGGAAATGATAATCCGAGATTAAGGAAAGGAGAAGATAAAA
AATAAA
AAAAAAATAATAAAACAGAAGCCGACCGGCCGCCGACCCGTTCCCCAGGACCAGCCTACGAGGA
ATGGATA
ACGCGGTGGCGACGGCAGCGGTGGTGGCGCTGGGGGTGGCGGCAGTGGTACTGCTGATGGTAGT
CGGGACG
GAGGAGAGGCGATGCATACATACACGCGTGCATGCTGCATGGGTGGATGGTACGGCCGGGAGAC
GCGGAA
GAGAACTCACATAAAAAGGTGACAAAAAGAGCGGTTGAAAAAAGAAAACGAGATTCGACCAGA
CAGAAG
AGAAGGACCGGGGCTTGGCGACCCTTCCACGACTGCTGTTGTCATCTCGGCTCCCCGTCTTCT
CCCGGCCAC
GGGCGGCTAAGTCACCGCCGTTCTCCCCATCCGTCCGAGCGCCGACCGACCAGCCGGCCGATTC
GCCCCCGG
GGGCTTCTGGAGAACGCCGGGGCAGCAGCGATCTGGGGAAGCCGCTAAACCCCTGCGTTTTTAT
ATGGTAGC
TCTGCCGAGCGCGGGCTGACGCGTTGAGTAAGCGGAAAGACGTGTGTGACGAAAAGGGGTCCCA
TGGTATT
TCACGTGACGATGAGGAGATGCGGTTTGGAGCACATACGGTTTAGAAAAAGGGAGTTGTCGTGA
CAAGGGC
TGAGGGACCTCTGTCTCCATGTGTGTATAAAAAGCAAGGCACGTTCATAATGTAAAAAGAACA
CGTTGTAA
ACAAGCTATTGCTGTATCATTCGGCTGACTATGCTTCATTCCGACTGATTTTCTTTTCCTAACG
GCGTAACTT
AAAGTGATTAACGTATGATATTTGTTCCCCAGAGTTATACTATAGTCATCATCCTAAAATTCAG
ATATAAATG
AACACATGTCGTATGGGATTATTAAGAAACCGAAACTCTCCACAGTTCACCATCTTCTTCGTCA
TTCAACCG
ATGACCCACTCCGTACAACGAATCAGTCTGCTGTGTCACACTGCAAACCTACTAGCGACGTATGC
AAACAACCT
TGAAACACGGGCTGTTGTATTGACGACCGTTGTACCATTACTAGTCACATTGCATAGAGACCAT
CCACCGTC
ATCCCATCTTTCCACCCGATGGAAAACCGTCTTCTATCATCAACTATGGTAAGATTTTCGACCC

TGCGAGGTA
TTCAGTTTCCCATATCCATAACCTGGATTTTATCATTAACCCCAATATTAAACACTTTTTTA
GTACCCCCC
ACCCACCAAAAAATGTGACTGGACCGGTTCCTAGCAGCTCTGGGAGCCATGTTTCAGGTTGAACC
ACAGCTAC
AGCGAAACCGAGTCCAGTGACCGGTAACCACGTCCAGCCCCTGCGTATGTACCAGTCCAAGCAC
GTCCGGTC
ATTGTTCTACACAGGAAATCTAACTAGGTCAACGCAATTTTATTCCACCGTTACGCAGAATACT
AACAAACA
AACACACAAATTTAACGAATTACACGTAGTTTATTACATGAAAACGTGAAGAACACCAATTCAC
TAAGCGAT
ACAACATTTAGCTGACTTCCAAGTGCCACACATCACCAGTGTATTCATCCATGTTTTCCACGAA
CCAACGAG
ACAGATCGAAGAAGCCAGAATCTCCCGACTTTAAATTACATAAATCCAACGTATTATGACCACA
GCTCGACA
CACAAATAGTTGCGTTACTATTACAGTAGCATTACCTATACCCGTAACGTTGCACAACCACTG
ATCACCATT
GTTACCAAAAACGGTTTTCCACTTAGTTGTCAACGGATCTTTCCCATGCGTAATGGTCAAATTA
CTACCAGTC
GTCGCTTTTAGCTCATTACGAGTATTATCCGCATCCACATATATCAACGTCATAGCTAGGCACG
CTATAAGTA
CCCCCCCCCACAATGGAATGTTGCCAAACCGGTTCTTTCCCGTTATAGCCATAGCGTTCCCAG
GCAAAAGC
AAACGCCAAACCTAATGCAGTGAAAAGCGCTTGCAGCCAGAACCAGCTTATGTACCAGCCACAA
TCACATC
CGGTTATTGTTTCCACAGGAAATCCTACCAGGCAAAGCCCCGCTTGTTTTGTTCCCTGACCATCT
TGTTTAGCA
ATTCGTAAACTGTCAGCCTAGCGACGTCCGTTTAGATCAAAAGTCACGTATATAGCGACGCTGT
TTCCACCC
GTTTCCCCGTCCCGCCGTTTCCGAACAACCCACCCGGGTTTCAGACAACCGACCACCAACAGAAA
TATACACA
CAGACCACCGGGAGTTTCAGTTAAAGATTTTCATCAGGTTTATTTTGGCTGCTGCTAGTCTTTTGC
TTCTTAGAA
AAAAAATACCCATATAGAGAAATAATGATAGTTTGACAACACATATGGCAGGGATTTCTTCTTC
ATCAATAA

GATATGCAATTCCCCAGGGAGAGACTTTCACAATTGAATTTACAAAAACAAAATTACATCAG
GAGAAAG
AGAGGATACATTAATAAATATATTATATCTGGTGTATATACTGAATGCTGCTGGTTCATAAGGT
AACGATGC
TACTTTTTTTAATTCCAAGATGGTTTTTCTTGTTAGTCTTTTGTGACTTGCTGGTTCCTAAA
AGTTCGCAAA
AACGATTGTGTGAAGATTATGACGTTGGTTGACTAGTTCATGAGATTCTGCTGTACGTGTGATG
GTTATTTCGC
TGGTTCGTTCTAAGATGAGTATCGTACTGTGTCTGCGATGGTCGTCTCTTACTGGCATTCTCTC
GGCTGCCTCT
TGTTTTTCATGATTGAAAAGGAAAAAAGGACTCCGAGGGCGCGGTCATCTTTTACTTTTCGGTTT
TCTCGTTGG
CGGGTCAGAGGTAGTCAGATCATGAGACTGTCGTGGTCGATGAAACTGTGTCTGCTCAAGTGAC
GTCCATTT
CTTGTACGGAGAAAAAAGTCATCGGGATAAATAAGGCTATACAAGGCGTTGTCAAGCGTGCGGC
TCTAAAC
AAATTAAGCGATACAAAATTACAGTGATACGAATAATAAATTACCCCCCTCCCCCTGTGGTCCCC
CCGAGGCG
AGAGCCACCCATCGTGTACTCTCGCACCCACGACCACAGGGGGAGACGGGACGAAGAGACG
ACGCAG
AGCGCCATCTCCTCCTGGAGGCCGGCGGCGTTAACTGCTACAGCTGCGGCGGCGACGACAGCTG
CGATTTGT
CGGCCGACATGCCGATGGTATGGGCGGCGGCGGCGGTGGCCGCGGCAGCGGGGAGGAGAGGAGA
GAGAAG
AGGAGCGGGGCGTCCGAAGGCGAGGATGGCATGGTCTCGCCGAGCGCCCGGCTTTTATGGAAC
ACTCGCG
TCCGGTTGGGTATCACCCACAGGAAGATGAATCACAACCTTCAAACCATCTTGAGACCCGAGTA
ACGGTTTA
CAGGTCGCACGCCAGTCTCAGCTAAAAACAGCGGACAGTCCCACGCTGTTTCTGTTGTGGCTCT
CTCCAGTTT
CCTCATCGCCGTCTTGGTCTCCGTTCATCATCGGAAGAATACCACCCGCTCTCATGCGGCAGTCG
ATCAGCCTC
GATGAACGAGACGCGGCGACGCCTTTCTACGGCCGACTGGTTGTGGTGGTGAAAGAAGAGCACC
AGCAATC
CCAGGAGGAGCAACAAGCCCTCACATGTCCAGGAGGTCGGGGAGAGGGCCTGTCGGAGATGACC

GTGAGG
CATCACGTACGGCAGCTGAGGAGAAACGGAGAAGAAAGGAAAATTACCGTCAGGGGCCGGGGTT
CTTATTA
GAGAAACAGCACGTAGGTCAGGATCCAGATGCTAATGGCAATCATGATGACGATGATCATGCAG
GCCAAGA
CGCGGCGCACCAATGCAGAATCCAATAGCCGCCGTGCCTCCGGTTGGTGGCCGGCGGCATCTAG
AGACATG
ATTTGGGGGGGGGACCGGCGGCGCAAAAAGACAGGGAGATGGACAGTGCCACGGTGTTTTGTTA
TGATTAG
GACATGGGGACCGGAAGCCGAGACAGAGTACTACAGGGTGTTGAAGGGTAACGTGAGGGAGATC
ATGTCAT
GGGCGGGCTGAAGACCGTGCGGGGAGGATCGACGTGTGCGGTGCTTGTGGAACACGGTGTTTTA
ATATGTA
TCCGCGTGTAATGCACGCGGTGTGCTTTTTAGCACTCGGCTTGATAAGCTACGTGACCGTCTGC
GCTGAAAC
CATGGTCGCCACCAACTGTCTCGTGAAAACAGAAAATACCCACCTAGCATGTAAGTGCAATCCG
AATAGTAC
ATCTACCAATGGCAGCAAGTGCCACGCGATGTGCAAATGCCGGGTCACAGAACCCATTACCATG
CTAGGCG
CATACTCGGCCTGGGGCGCGGGCTCGTTCGTGGCCACGCTGATAGTCCTGCTGGTGGTCTTCTT
CGTAATTTA
CGCGCGCGAGGAGGAGAAAAACAACACGGGCACCGAGGTAGATCAATGTCTGGCCTATCGGAGC
CTGACAC
GCAAAAAGCTGGAACAACACGCGGCTAAAAAGCAGAACATCTACGAACGGATTCCATACCGACC
CTCCAGA
CAGAAAGATAACTCCCCGTTGATCGAACCGACGGGCACAGACGACGAAGAGGACGAGGACGACG
ACGTTT
AACGAGGAAGACGAGAACGTGTTTTGCACCATGCAGACCTACAGCAACTCCCTCACGCTTGTC
TAGTCACG
TCGCTGTTTTTATTACAGCTCAGGGAAGTTTATCGAATGCCGTGGAACCAATCAAAAACCCC
TAAAGCTC
GCCAACTACCGCGCCACTTGCGAAAACCGTACACGCACGCTGGTTACCAGGCTTAACACTAGCC
ATCACAGC
GTAGTCTGGCAACGTTATGATATCTACAGCAGATACATGCGTCGTATGCCGCCACTTTGCATCA
TTACAGAC

GCCTATAAAGAAACCACGCGTCAGGGTGGCGCAACTTTCACGTGCACGCGCCAAAATCTCACGC
TGTACAAT
CTTACGGTTAAAGATACGGGAGTCTACCTTCTACAGGATCAGTATACCGGCGATGTCGAAGCTT
TCTACCTC
ATCATCCACCCACGCAGCTTCTGCCGAGCCTTGGAACGCGTCGATGCTTTTATCCGGGACCAG
GCAGAGTC
GGTGTGGTCACGGATTCCCAAGAGGCAGACCGAGCAATTATCTCGGATTTAAAACGCCAGTGGT
CCGGCCTC
TCACTCCATTGCGCCTGGGTTTCGGGACTGATGATCTTTGTTGGCGCACTGGTCATCTGCTTTC
TGCGATCGC
AACGAATCGGAGAACAGGACGTTGAACATCTGCGGACGGACCTGGATACGGAACCTTTGTTGTT
GACGGTG
GACGGGAATTTGGAATAAAAGATGCGTAACACCTGTCGAAGATGCGATAACTTTACATACAGGC
AAACAGT
GTATACAATTATAGTATTTTGTATGTTGCATAAAGTTACATGCAACAGTACTGCTAACAGTACT
GCATCCATT
ACGCTATCCAACACTGCCTCTACCACTTTTGTAAACCAACATATATTCAACTCCGAATAACAACA
CATCAACG
ACGCCACACACATCTGTCACCTCACAAGCGTCAACCATTGGCAACATCACCAACGTTACCTCCG
ACTTGAGT
ACTTTCACAACCGTATATTCTACATTCAATACATCATTTGCCAATATATCTAATACGGCTGTCA
CTACAGAAT
TGATTTCAACAAATACCAACACTATCTCATCTTTTACCAACGTAACAGCAAACGCTACATCATC
TTATAACAC
AACAATCACCGTAACTGTCACGTCAGATGAACTTCGCACAACGTATCCACTAATAATGCACTT
ATAAGCAC
ACCATGGCCTACAAATTGCAGCGCCACAACATACACCACGTACAACCTTACTAACTCTTCCAAC
GCTTGTC
CACAGAGACAACAATCATACGTTTCAAGGAAACCAATACAACAGGAATAGAAGGGAGTAATGTC
ACCATAA
AGGGTAATTCTACGTGGGACTGTCTTTCAGTCGCCTGGATACGACATTACAATAGATCCACACA
CGGACATC
ATCTAGGTATATCGTAAGAACGCACATACCCAATCTTGGTATTGGCTACGCATCCTTACCTCTCA
CACTGTATG
TCATTCTCAACATGAAAGACCTTCACTGTACCATGACTTATGTCGTTTCGTGCAACAACACAGAA

TTACATCTG
TACGATCTAAATATCACCAATTCCGGCAGGTACAGCAGACGTTGTTTTAAAGAAAATTACTTCA
CAGGACAT
CACGAAGATGAAAATTTCTACCTATTAGTAACACCAAAAAATCATACTGAAGCTATTAATGCTA
CTTTCGTT
TGCCCTAGATACAACACCGATATCGAAAATGAAGATAGAGAGAAAGGAAGTCAACATACTAACA
ATACACA
TCACCACAAACGTAATCTCTATCATAGCTCGCAAAGAAGCCGCACCGTATGGACCATCGTGTTG
GTTTGTAT
GGCCTGCATAGTTCTGTTTTTTGCACGACGAGCCTTTAACAAAAAGTATCATATGTTACAAGAC
ACCGTCAG
TGAATCAGAATTCATTGTTTCGATATCACCCAGAACATGAAGATTGAGCTACGTTTCCGGGCAGA
CATCTTAT
GAAGCTGAACAATAAACTAAACATTCTGTAAGACTCAGCGTTCAAAGGAATATTAATGCCCAT
TGAGCGA
AAACTAATATTGCAATGGACTGGCGATTTACGGTTACGTGGACGATACTAATGTCCGCGTTGTC
AGAAAGCT
GCAATCAAACCTGTTCTTGTC AATGTCCCTGTAGTACTACCGTTAACTATTCAACTAGTACTGA
GACAGCCAC
ATCAACATACAGTACAACAGTTATCAGCAATAAAAGCACTTCAGAATCTATAAATTGCTCTACT
GCAACTAC
ACCAGCAAACACCGTTTCTACAAAACCGTCGGAAACAACCACACAGATATCCACAACGACGAAC
ACAAACG
TTGAGACTACCACATGTACCAACACCACCACGACCGTTACTTGTGATGGTTTCAATTATACAGT
CCATAAAA
GATGCGATCGCAGTTACGAGGTAATCAACGTAACAGGATACGTTGGTAGCAACATAACTCTAAA
AAAATGC
AATCAGACTGAGAAATGGCACAATGTAGACTGGATTCAATTATGAGTACCCACGCATAAAATGT
GCGAATT
AGGCAACTATCACCAAACCACACCACGGCACGACATATGTTTTGACTGCAACGACACCTCCCTA
ACTATCTA
CAACTTAACCACAAAAACGCTGGAAAATATACCAGGCGTCACCGTGATAACGGTCAAGAAGAA
AATTACT
ACGTAACGGTGTTAATTGGAGACACAACGTTATTCCTCTTGGCACATGCCCTGTAAGATATAA
AGAATCTA

CGAACACTGAAAACACCATTGGAAGTAGCATCATAGAAACCATTGAGAAAGCTAACATTCCCCT
GGGAATT
CATGCTGTATGGGCAGGCGTAGTGGTATCAGTGGCGCTTATAGCGTTGTACATGGGTAGCCATC
GCATTCCC
AAAAAGCCGCATTACACCAAACCTCCCAAATATGATCCAGATGAATTTTGGACTAAGGCTTAAC
ATGCTGAT
CAATAAACTTTTTTTAACCAATAACATGTCTCCGTTTTTTTTTGTTAACAACCTATGATATAAA
GCGTTATATT
CAGTCGTTACTAAACAAAAAACATGGGCATGCAATGCAACACTAAATTGTTATTGCCAGTCGC
ACTAATAC
CGGTTGCAATCATCCTAATTGGTACTCTAGTGCCGATACTTTTACATGAACAAAAAAGGCGTT
TTACTGGC
GACTTTTTCTGCAAAGTCAACATGTAGAAGCACCCATTACAGTAACGCAGGGAGACACAGTCTA
CCTAGACG
CTAGCAATAATCCCTGTAATTATTCCAGCTTTTGGTACCACGGTAATTGCGAACTTTGTGGATG
GAACGGAT
ATCTACGCAATGTTACACATTACTACACAAACACATCGTGTTCCCCGCAATTCATCTGCATAAA
CGAAACTA
AAGGTCTGCAGTTATATAATGTAACATTAAACGATTCAGGCGCTTATACTGAACACGTTTACGA
ATGTGACC
TTTCGTGTAACATTACTACTAATAACGAATATGAAATACTCAATTATTTTGATAACTGTAACTA
CACCATAAA
TAGCACCAAGCATATTATCACCGTGGTGTCTTCACGTCATTCTAAACAAACAAATTCCCACGTA
TCCACTCAC
GCTGGTTGGGCAGTCGCCGTGGTGACGGTAATTATGATCTACGTTCTGATCCACTTTAACGTCC
CGGCAACTC
TGAGACACAAACTACGAACTAGAAACAACGTAAATCGCATAGCGTGATTATAAAGTATCGACGC
TAATTTCT
CCAAGATAAAATTTGATTACTCCGTGCAGTTCTCAAAAACGTGAAGGCCCCGCTTTTCCACTCC
GTCATGAA
GGATCGCAATAGAATACTGCTATGTATCATCTTTATTTGCATTATGTGCCTCATTTGTATTTAC
TTTAAACGTC
GTTGTGTTTTTACTCCGTCTCCAGACAAAGCAGATCTGCGAGTGGAATTTCCCTCGTTACCCCC
GTGTATTGG
CATACAGTGCGCTGCATGAGAACACGCGTGACACATAGCGTACCCCTGGACGGTACAGTTTATG

ATAACGTA
ATTCAGGGAAAGTATACATTTCATACCAACATGTTATCACATAACACACAGATTTTCTGCGTGTT
TTATAAAA
GAGCGTCTCGAAGCAGCTTGAGCCACACTACGGTCCAGATGACGAGCGTAATTAAAAATATGCC
GCGCAGT
ATTCGAAAGCCGTACTGAGCGTGCGAGGCGGGTAGGGTGCCGAACGACGGATATGCGTCGTTGT
CATCTTCG
ACTATAAGGATCGCGACCGAGTCTTCGGCCATGGTAAACGTCACCCTGTGTGGCTGGTATGTAG
CGTATCCG
GTTTGGAATTGTTCTGCTCCAGCTCGGGGGATAGTGAGGAATTCTCAAGGGATACGGGACCCAA
TGACTGGA
TAAGAGAAGGGTTTTTCCCGTAAGATGATCCTCGTATCACATGAGGTCTGGATATGTATAAAT
GAAGAGTG
AAATAGGCACAGGGAATCAGATGCCAGCCTCGTGATGCAGCCGCTGGTTCTCTCGGCGAAGAAA
CTGTCGT
CTTTGCTGACTTGCAAATACATCCCGCCTTAAGCGATGAGTCTATAAAGCACCGTTGCCCGAGT
ACGGTAAA
AGTGACCCGGATTGTAGAACGTCCTTTTTTTTTGTTTTTGCATCGTTTATCGTCACTACTAGTG
CAATATTTTG
ATTGTAAGGCTGAAAGAGTATCGTTATGATGCTTAGAACGTGGAGATTATTACAGATGGTACTG
CTTGCCGC
GTACTGTTATTATGTTTTTTCGACTTGTTCAATCAGCACGACGACTGCTCCTGTGGAATGGAAG
TCTCCCGAC
CGTCAGATTCCCAAGAATATTACCTGCGCTAATTACTCAGGGACCGTCAACGGCAACGTTACAT
TTCGAGGT
CTTCAGAACAAAACGGAAGACTTTTTGTACTGGTTGTTAGGATGGGGTCATAAGTCCATTTGTT
CGTTCTTCC
CGAAACTCCAGGGTAACTATGACGAACAACATTACAGATATGAAGTAGCGAACCTGACGTATAA
CTGCACC
TATAACCGCTTGACGTTGCTGAATCTGACGACGGAAAACAGCGGAAAGTACTATTTCAAAGGG
AAGATGC
GAATTTACCTTCTATTACTCTTGTTACAACCTTGACCGTGTCTAAAGATCGCACGTGAAGTTT
CACAGAGCC
GCGTGGCTGTAGCTATTGTGTTTACGTTGCTTTTGAAATGTTAAGCGTCCCTACGGCGCTAACA
TGTTTCTAG

GCTACTCTGACTGTGTAGATCCCGGCCTTGCTGTGTATCGTGTATCTAGATCACGCTTAAAGCT
CATGTTGTC
TTTTGTGTGGTTGGTCGGTTTGCGTTTCTATGATTGTGCCGCGTTCGAGTCCTGCTGTTACGAC
ATCACCGAG
GCGGAGAGTAACAAGGCTATATCAAGGGACGAAGCAGCATTACCTCCAGCGTGAGCACCCGTA
CACCGTC
CCTGGCGATCGCGCCTCCTCCTGACCGATCGATGCTGTTGTCGCGAGAGGAAGAACTCGTTCCG
TGGAGTCG
TCTCATCATCACTAAGCAGTTCTACGGAGGCCTGATTTTCCACACCACCTGGGTCACCGGCTTC
GTCCTGCTA
GGACTCTTGACGCTTTTCGCCAGCCTGTTTCGCGTACCGCAATCCATCTGTCGTTTCTGCATAG
ACCGTCTCC
GGGACATCGCCCGTCCTCTGAAATACCGCTATCAACGTCTTGTCGCTACCGTGTAGCTAGTTAG
CCAGCTGT
GTGTAGTGTTTTGCTTTTGCATATTTGTTTTTCAGTCAGAGAGTCTGAAACGGGGTGGGAGGGAC
TTTTGCGGG
TAGTGATGCTAAGATGAACGGGTGGGCTGGGGTGTGCTTGATAACTCACTGTTTGAATACGCG
CTCACGCA
CATATGTAGCACTCAACATGTTAGCTTTTGCCCGCACGCCCCGGGGCGTGCCGAGCTGCCTTTT
TAATAAAGT
CTGGGTTTCCAGATACGCGCTGGTTCTGATTTTGATGGTTTGTGCCTCTGAAAGCTCTACGAGC
TGGGCCGTG
ACATCCAATGGACTGCCTAACTGTAGCACGGTAACTAGAACAGCGGGTCAAGACGCTGAATTGC
ACGGTCC
GGCACCGTTAAGCTGTAATGTGACCCAGTGGGGACGTTACGAGAATGGAAGCACACCCGTGTTA
TGGTGCA
CTTTACGGGGATCAAGCATGCGAGTCTCATTAGGACACCGTGTAGCGTTTGGCTGTTCTTGGA
AACATTTTT
TATTTATAACGTTTCTGAAAGTAGCGGTGGCACTTACTATCAAAAAGGTTACAACTGCACCGAC
AAACATAT
AACACTATCTTGTTTCAACTTAACGGTGGTTCCTCGAGCGGTTCAAAGCACAAACCACCGTAATG
ACACCCAC
GCTGGTTACAACTCCACATTCAGTGTGTCACTTGTTCCGTTGAGACTGACGACAAATTCCAGC
GCGTTTGG
ACACGCTATTTATCAACGACAACAGCGTGTTGAAAACGGGACGTTATCCAAGAACATAACTAAC

TTGGCATT
CACCTATGGCAGCTGGGGCGTTGCGATGCTGCTGTTTGCCGCCGTGATGGTGCTCGTTGATTTG
GGTTTGCTT
CAATCGGCTTGCGACGCTGGCGAAGCCACGTGGACGATGAAGAACGTGGTTTGTTAATGTAGG
AAATAAA
AGGCAGTTTGAGCATGACTGTTTCCAAACCGTAACGTGGTAAATAAATCATGGCTTCCGACGTG
GGTTCTCA
TCCTCTGACGGTTACACGATTTGCTGTCAGAGTGCATTATGTGTACAATAAACTGTTGATTTTA
ACTTTGTTT
GCCCCGTGATTCTGGAATCCGTCATCTACGTGTCCGGGCCACAGGGAGGGAACGTTACCCTGG
TATCCAAC
TTCAC TTCAAACATCAGCGCACGGTGGTTCCGCTGGGACGGCAACGATAGCCATCTCATTTGCT
TTTACAAA
CGTGGAGAGGGTCTTTCTACGCCCTATGTGGGTTTAAGCCTAAGTTGTGCGGCTAACCAAATCA
CCATCTTC
AACCTCACGTTGAACGACTCCGGTTCGTTACGGAGCAGAAGGTTTTACGAGAAGCGGCGAAAATG
AAACGTT
CCTGTGGTATAATTTGACCGTGAAACCCAAACCTTTGGAAACTACTCCAGCTAGTAACGTAACA
ACCATCGT
CACGACGACATCGACGATGATCGACGCGAAAAGTAACGTTACAGGGAACGCCAGTTTAGCACCA
CAATTAC
GTGCCGTCGCTGGATTCTCCAATCAGACGCCTTTGGAAAACAACACGCACCTGGCCTTGGTAGG
TGTTGTTG
TGTTTTTTAGTTCTGATAGTTGTTTGCATTATGGGGTGGTGGAAATTGTTGTGTGGTAAACCAGA
GTTATAGTA
ATGTGCTTTTTATCAGGGAGAAGGTTTTGTGCCAACAATGACTAGCCCGGGACTATCTGCGTCA
GAAAATTA
TGACGGAAATTATGAATTCACGGAAACCGCCAATACAACGCGTACAAATAGAAGTGACTGGACA
ACGTTAG
AAACCAGTGCATTGCTATTGAAAAACACGGAGACTGCAGTGAACCTCAGCAACGCGACTACGGT
CATCCCA
CAACCTGTAGAATAACCGGCTGGGGAAGTACAATATCAAAGAACGGCAACGCATTATTCTTGGA
TGCTAATC
ATTGTCATCATTCTCATCATTTTTATTATCATCTGTCTACGAGCACCTCGAAAAATCTACCATC
ACTGGAAAG

ACAGTAAACAGTACGGACAAGTGTTTATGACAGACACGGAAGTGTGACAGTGATGTCTAAGCGT
TTGCAGG
TATTTCCATGGATAACAATTTTATTTTACACATCAAAATCCCAGTATTGGAAGTATATGGCAAT
ACCATGTAC
CCCTACAGTTGGATACGGCAGTCATAATATTAGCTTGCATCCGCTTAATAACTCATTATTTCAA
GACGATGTT
TTTGAATGGTACATAGACAAACCAATGGTTACAAGTTATGTCTTTATCAAAGTAATGAACGCAC
AAAATCCA
ATCTAGACTCTCCAAATATTGTGTGGCAATGCACAGATAATCGTACACTAATTCTCATGAACTT
AACCACAA
CATACAGTAGAACTATTATTTTCAATCCTTTAAATATCTCGGACGAGGAGTACCAAACCGAA
TAACTTGT
GTTATAACGTTAGTGTAAGTACTTTACCCACCAAACACATTGCCATACAAGTACATCATCCCTGTA
TCCACCTAC
ATCTGTACACGATTCATTAGAAATATCACAGTCATTCACCTCAACCAACTTCACACATACCGCG
GTCCACTA
CGCCACCGGTAACGTTGAAGCACAACACGACACTACCACTCCACATACAATGTGGATCATACCC
CTAGTTAT
CGTTATAACAATCATCGTTTTAACTTGTTTCAAATTCCTCCAGAAAGCTTGGAATAAATTCACA
CAATACAG
ATACAGCGGTATGCTCGCCGCGCTTAAAGAATCAACGCCAAGGAAACCAAAACGTAAAAAGAA
TAGATAT
GTACGTTTATTTTTCAGCTCACTGTTTGAATACCGTAAACATAATGACGTACATATACGTGGTT
ATACAACAG
GTGTTTGTGTTATGCGGCGACTGATTAACCATATCGTGAACCATGATCTTTTCCGATGGTCCGT
CGTGACCGC
AATGATATTTTACAGATATTCCGAAACCTGTATGGAGGTCAGTGTGAGTAGGTGATCCAGTT
ACCCTCGG
TAGTGGACATGGTTATCATCCAGGTAGGGATAACAGGGTAATGATCCTCTAGAGTCGACCTGCA
GGCATGCA
AGCTTGAGTATTCTATAGTCTCACCTAAATAGCTTGG

SEQ ID NO: 12

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LKA1

Описательное название - последовательность gp49 LKA1

ATGGCGCAAACACCCAGTACATGGGCCGACTACGTAGGCGACGGCGTAGAGGATACGTTCCAAG
TCACAT
TCCCGTACCAGAAGCAGCAAGAGGTGTTTGTGACTGTGGGCGGCGATCCGGCAGCTTTCACATT
CATCTC
GGCAGGTTGGATTCAACTGGCAGCGGTCCCGGTAAATGGGGCCGCAATCCGTGTACGGCGCAGC
ACTGAG
GCATTCGAGCCTCGGCACGAGTTCGCCAACGGCGTGCCATTACTGCCGCGATTTCATAGACGAGA
ATAATA
CCCAGTTCTTGTACACTGTACAAGAGGCAGTGAATGAGACACATGGCATTGCTTCCGAAGCGCT
GAGTGT
CGCAGAGGAGGCCAGAGGCATTGCGCAGGCGGCATCGGATAAAGTGGATGCTGCCACCATTGAC
TCCGCA
CACCAGTTGCGTCTAGACCTCGCCGACCCGGCGAAGGGGCCTGGGCTGCTAGGCTACGACCGAG
ACGTAA
GTTATCCGGTCGGGTCGGTCGGTCAAAGCCTACAGTTTCTGGAAATGGGTCTGGGTACACCAGC
GCAATT
TGGCGCCGTTGGTGATGGCGCCAGCCACCCCTCTCTGAGCGATACGCAACTCTAGCGGAAGCT
CAGACT
GTCTATCCGCATGCAGTCGCACTCTCCGACGAAATAGACTGGGCCGCATTGCAAGCTGCCGTGG
ATTGAG
GGGCACCTGTACACATACCGTCTGGGGACTATCAGATAAATAGGGGGATTAGCAGTACGGGCTC
TCTACA
GATTGCGGGTGATGGCGCTACATCTATTATACGCCCGACTGCTGCGTTCACTGGTACATCGGTC
CTCAGT
TGTGTGGGGAGCTTAGTTGCCTTGCCGAATATATCCTCCGTGTCGGCTGGGTCCCTAACCATTG
ACTTTG
CCAGCACCCCTAATCTTGTAGCGGGGGATGTATTCATCATCTACAACCCGACTGATAGCAGCTT
CTCGGG
ATTTTCGGACGAGCTATCGCGCAGGAGAGTTCTGTGAGGTCAGGGCGGTTTCTGGGAACACCGTG
ACAATC
CGTTCGCGCACTCTATGCCGCATACGACGGGGCTACTGTTGCTATTTACAAAGTAGTCTCTGGTG
TAGTTG
ATATAGCTAGCATCCAAATCGTTGGCGGGACAGTCCCAATGAATGGACTGTTAGTGGAGGCTGT
CGTTTC
ACCGCGCGTCGATGACGTGACGGTCACCCTTGCAAACAACGCCGGTGTGTATTTTGCCCGCTGC

TATGAC
GCTAAGATCACAAACAGTAATATATCGAACATCGGCGACGGTGGCGATGACTATGGAATCATCT
TTGGGA
ACTGTCACGACGGTGGGGCAGACAACGTAAAGTCTACGCTAGGCGACATGCCATCGCCACGGG
CGGCGA
TGCAGAAGTAGGCTGCGTTCCGGTCCGTAATGTGCGTATGCGTAACTGCACACTTAGGAATGAT
ATTACC
TCTGGTACACACTGCGCAGACTTCCACGGTAACGCCGAGGATTGCAGCTACGAAAACGTGCACAA
TCTACG
GTGGTGCAACTTGGCAGGGGAAGGATATCAGCTACAGACACTGTACAATCACTAACGCGTCGGG
TGGTTG
GATTGTTATATCCGCTGAGATTCTTGGTGGTACATTCCTTCTCGACCAATGCACATTGTACACA
ACCGGC
GATCCGCAGCCTGGTAACCGTGGGGTTATAGATGTAGGTGGGAACCTCCGCAGTCCTCACTACAA
ATACAA
CGCAACCCTGTAACCTTCCTTATACAAGGCGGCAGTCTGCGAGCGCCCAGCTTAAGTACGTCTAG
TTACCT
ACTGCGCGCACGTCTTGAGGGTAGTACAGTTCCAGTAAACATACAGTACAGCGGACAGGCTATT
GATGTA
GGCTCTCTGGGCAAGGTACTACAACCTCGATATTACCTCGGGCAGTACCTCTCCTGAGTATTTGA
TCGTGG
AGAATTTAGCGGGGTTGCCATCTGGCATCACGCTGGCGTCTGCTGCTGGTGGTTTCGCAAGTGC
CCCGAT
GCGTATGCCTGTGCTGGGTGGTAGGGTTCAAGTAACTACGGCAACCAACGCGAGTAGCGTTACT
GCTCCA
GTAACGTTTCAGGTACATTTATCCTAAGGCCCAACCGTCCAGGTCACAAAGACGGACAGGAGCT
ACGCCG
GTAACAGGGTCGGCGTTGCTATCGCCAATCCGACCTCTGCGTCTGGGGCGACGTTGGGTCTGTT
CACGGA
CGACGGGACAACTTTAGCTCAGCCGTTACTAACCAGTTGAACTGGCAGGCAGGTATTTATGAG
GTGTAA

SEQ ID NO: 13

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus NTUH-K2044-K1-1

Описательное название- gp34 NTUH-K2044-K1-1

ATGGCCCTGATCCGGCTCGTGGCGCCCGAGCGCGTGTTTCAGCGACCTGGCCAGCATGGTCGCCT
ATCCGAAC
TTCCAGGTGCAGGACAAGATCACCTGCTGGGCTCGGCCGGCGGCGACTTCACCTTCACCACCA
CCGCGTCG
GTGGTGGACAACGGCACCGTGTTTCGCCGTGCCCGGCGGCTATCTCCTGCGGAAGTTCGTGGCC
CGGCGTAT
AGCTCGTGTTTCAGCAACTGGACCGGGATCGTCACGTTTCATGAGCGCGCCGAACCGGCACCTGG
TGGTGGA
CACCGTGCTGCAGGCCACGAGCGTGCTGAACATCAAGAGCAACAGCACGCTGGAATTCACGGAC
ACGGGCC
GCATCCTGCCCCGACGCCGCCGTGGCCCCGCCAGGTGCTGAACATCACCGGCTCCGCGCCCTCGGT
GTTTCGTGC
CCCTCGCCGCCGACGCCGCCGCGGGGTCGAAGGTGATCACCGTGGCCGCCGGCGCGCTGTCCGC
GGTGAAA
GGCACCTACCTCTATCTGCGCTCCAACAAGCTGTGCGACGGCGGGCCGAACACCTATGGCGTCA
AGATCAGC
CAAATCCGTAAGGTGGTCGGCGTGAGCACCAGCGGGGGCGTGACGTCCATCCGCCTCGACAAAG
CCCTGCA
CTATAACTACTACCTCTCGGATGCCGCCGAAGTGGGCATCCCGACCATGGTGGAGAACGTCACC
CTGGTGAG
CCCGTACATCAACGAGTTCGGCTACGACGACCTGAACCGCTTCTTCACCAGCGGCATCTCCGCG
AACTTCGC
GGCCGACCTGCACATCCAGGACGGCGTCATCATCGGCAACAAGCGTCCGGGCGCCTCCGACATC
GAGGGCC
GCAGCGCCATCAAGTTCAACAACCTGCGTGGATAGCACCGTGAAGGGCACCTGCTTCTATAATAT
CGGCTGGT
ACGGCGTGAGGTCCTCGGCTGCTCGGAGGACACCGAGGTGCACGACATCCACGCCATGGACGT
GCGCCAT
GCCATCTCCCTGAACTGGCAAAGCACCGCCGACGGCGATAAGTGGGGCGAACCGATCGAGTTCC
TGGGCGT
GAACTGTGAGGCGTACAGCACCAACCCAGGCCGGCTTCGACACCCACGACATCGGGAAGCGTGTC
AAATTCG
TCCGCTGCGTGTCTTACGACAGCGCGGATGACGGCTTCCAGGCCCGCACCAACGGCGTGGAGTA
CCTCAACT
GCCGCGCCTACCGCGCCGCCATGGACGGCTTCGCCTCGAACACGGGCGTCGCCTTCCCGATCTA

CCGCGAAT

GCCTGGCCTACGACAACGTGCGCAGCGGGTTCAACTGCAGCTACGGCGGCGGGTATGTGTACGA
CTGCGAG

GCGCACGGCAGCCAGAACGGCGTCCGCATCAACGGCGGCCGGGTCAAAGGCGGGCGCTACACCC
GCAACTC

GTCGAGCCACATCTTCGTGACGAAAGATGTGGCGGAAACCGCCCAAACCAGCCTCGAGATCGAC
GGCGTCT

CCATGCGGTACGACGGCACCGGCCGCGCCGTGTACTTCCACGGCACCGTGGGCATCGATCCGAC
GCTCGTGA

GCATGTCCAACAACGACATGACCGGCCACGGCCTGTTCTGGGCCCTGCTGTCCGGCTATACCGT
GCAGCCGA

CCCCGCCGCGCATGTCGCGCAACCTGCTCGACGATACCGGCATCCGCGGCGTTCGCGACCCCTGGT
CGCGGGCG

AAGCGACCGTCAATGCCCGCGTCCGCGGGAACTTCGGCAGCGTGGCCAACAGCTTCAAGTGGGT
GTCGGAG

GTGAAGCTGACGCGCCTCACGTTCCCGTCGTCGGCCGGCGCCCTCACGGTCACCAGCGTCGCCC
AAAACCAG

GACGTGCCGACCCCCAACCCGGACCTGAACAGCTTCGTCATCCGCAGCAGCAACGCCGCCGACG
TGTCCCA

AGTC GC CT GGG AGGT CT ACCTGT G A

SEQ ID NO: 14

ДНК

Род/вид - T7-подобный Pp15

Описательное название - добавлена последовательность gp44
Pp15

ATGGCACGAACTATCGTCCAGAACGCCCTAACAGGCGGACAACAGGACTTCGAGGTACCTTTTCG
ACTACATC

TTGCAGCGCTTCGTAAAGCTTACCCTGATCGGTGACGGTAACCGACAAGAGCTGGTCCTCGGTA
CCGACTTC

CGGTTCATCGGTCCTCGCACCGTTCGCACTAACGTCTTCTGGGGACCAGCGCAGGGGTATACCT
CCATCGAG

ATCCGACGAGTTACCAGCGCTTCTGATCGTCGCGTAGAGTTCTCGGACGGGTCCATCCTGACCG
CAGGTGAT

CTGAACATCGCCCAGCTTCAGGCCATCCACATTGCCGAAGAAGCGCGAGACTCTGCCACTGAGA
ACCTGAG

CCCAGATGCTGATGGCAACTACGATGCACGTGGTGC GCGCATTTACAACCTCGGTGACGCTGTT
CAGCCGAA
GGATGCGGTCAACCGGTACACTCTTGACCTCGCTATCGCAGCCGCTCTGGCCATGAATACCGGC
AACCCGAA
CAACGCCCAGAACATCTCGTACACCCCTAACGGGCCTGGTCAGTCGATCCGAAGTGTTGAAGGC
CGTCTGCG
GGATGCTGTGTTCTGTCTCGGACTACATGACCACTCCACGTGATGGAGTTACCAGTAACCAGCAG
GACCTCGA
AAAGGCACTCGCTGCGGCGAACGCTAAAGGTGCCGACCTATTCTGGCCTGACGACATCCCGTTT
TTCTCCAC
GTCCCCGCTGGCACTGATCCACGCGGTCTACCATGTTGGACGTGGTGTCATCAACGCGAACGGT
ACGCTGTT
CTACGTGAACCCGAAGAACGGCCAACACAACAGGCTACACGTGTCTCCCGGGGGCACCGGGGAT
GGTCTGG
CAGCTGGCCGCCCCTGAGGACCATCTGGAGTGCACTCGCGGCCCTTAACATGCGAGCCCCACT
GACCACGC
GCTGGTCCTTGGAGATGACCGCTGGCGCCTATAATGAAGCCGTTACACTTCCGAACCTACCTGAC
CAGCTGTA
ACGACTACTTGGCGTTTAACTGGCCGAACACCGGTGAGAACGTATGGAGCCCCACTGCGTACCC
ATCAGCTC
TCGACGGCACAGGCCAGACCGGCCTCACAGGTTTCCACACTGGCATCGGCAACCGCATTACCAT
CAACAAC
GTGTGCATGTCCAACCTGGTACGACACTGCGCTGACTCCTACCCAACAGGTGCGAAGAGCGTTTCG
TTGTAGGT
GCGTATTCGACTGCCTACGTGGTCAACTGCGCGTTTCAATTTACAACGGCATCGCGAGCGTGTCTG
TGCTGCCC
GGTGGCACTGCTATCGTAACCGGTGGCATCGTCGATGGTGGGCGGTTTCGGCCTCGACAACACTG
GCGGTCGC
CTGTCCCTGACGGCAACCAAGAGCAATTATACGCAGGTCCGGAACCTGCCTCGAATATGGACTGT
ACTCGAAG
CATGACGCATCGACCGTAATGGACAACACCGAGTTCCGCAACTGCGGTAATCACCTGCGGCTG
TTGCGTAT
GGTGCTGCAATCTTCGCGTACAAGTTCAACTGTTCTGTTGACACTCGTGGGGTCAAGTTCTACG
GCAACAAC
ATCGCCCAGCACTGCCGTGGCGGTATCACCTCGGACAATCCGGGCGATCCGGACATCTACGGTA

CCGGCGCA
GATGCTAATAAGCGTCTATTCCCTGTGCACCGGTGGTGGCTCTGACGACATCCAGTTCTACGAAG
CTCGGCGC
GTCATGGACATCACGAAGCGCACTGGTGGCGGCTCAACTACTGCCAGCGTATCGTCGCTGCTAC
TGGCTGCC
GTTGCGTCTGTCCGTAAGGGCTACTTTGCGCACAACGATCAGGTGATCCGGATGACCCTGATGT
TCCGCGCT
ACAGGCTCGGCTGGCATCTTCACGCCGACCTTGCGCACACCTCTGGGGACTATCCCTCTGGGTA
GCTTCAGG
GTCGCATCGGGACAGTACGGCGAGATCAAGTTGACCATTTCGACCTACTCTGACATCTGATGGTC
TCATAGTC
GGGTTCTCCTGCATCAACGCCGTGCAGAATCTTGGGTCCTCTGTTGGTCAAATCATCGTCAGCG
GCACCGTA
GACCTCCGCACCGTCGACCAGCTGGTCGAGATGTGGGGCTATTCGGAAGCTGGTGGCACCGCTT
CGTACATT
CAAGGCCT GATCGAGCT GGTCGGGT GA

SEQ ID NO: 15

ДНК

Род/вид - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Описательное название - добавлена последовательность dspB

ATGAACTGTTGCGTCAAGGGCAATTCCATCTACCCCCAGAAGACCTCCACCAAGCAGACCGGCC
TGATGCTC
GATATCGCCCGGCATTTCTACAGCCCCGAGGTGATCAAGAGCTTCATCGATACGATCAGCCTGA
GCGGCGGC
AACTTCCTCCACCTGCACTTCTCGGACCATGAAACTATGCCATCGAGTCGCACCTGCTCAACC
AGCGGGCG
GAGAACGCCGTCCAGGGGAAGGATGGCATCTACATCAATCCGTACACCGGGAAACCGTTCCTGA
GCTACCG
CCAGCTGGACGACATCAAGGCCTACGCCAAGGCCAAGGGCATCGAACTGATCCCGGAGCTGGAC
AGCCCGA
ACCATATGACGGCCATCTTCAAACCTGGTCCAGAAGGACCGCGGCGTCAAGTACCTGCAGGGGCT
GAAATCC
CGCCAGGTGGACGACGAGATCGACATCACCAACGCCGATAGCATCACCTTCATGCAGAGCCTGA
TGAGCGA
GGTCATCGATATCTTCGGCGACACGAGCCAGCACTTCCACATCGGCGGCGACGAATTCGGCTAC

TCCGTCGA

GAGCAACCACGAGTTCATCACCTACGCCAACAAAGCTGTCGTACTTCCTGGAGAAGAAGGGGCTC
AAGACCC

GCATGTGGAACGACGGCCTCATCAAGAACACCTTCGAGCAGATCAATCCCAACATCGAAATCAC
GTACTGG

TCGTACGACGGCGACACCCAGGATAAGAACGAAGCGGCCGAGCGCCGCGACATGCGCGTGAGCC
TGCCGGA

GCTGCTGGCGAAGGGCTTCACCGTGCTGAACTACAACAGCTACTACCTCTACATCGTGCCGAAG
GCGAGCCC

GACGTTCTCGCAGGACGCCGCCTTCGCCGCCAAAGACGTGATCAAGAACTGGGATCTGGGCGTC
TGGGATG

GCCGGAACACCAAGAACCGCGTGCAGAACACCCATGAGATCGCCGGGGCGGCGCTGTCGATCTG
GGGCGAG

GATGCGAAGGCGCTCAAGGACGAGACGATCCAGAAGAACACCAAAAGCCTGCTCGAGGCCGTCA
TCCACAA

GACCAACGGCGACGAGTGA

SEQ ID NO: 16

ДНК

Род/вид- *Staphylococcus aureus*

Описательное название- добавлена последовательность SaPSMa3
ATGGAGTTCGTGGCGAAGCTCTTCAAGTTCTTCAAGGACCTGCTCGGGAAGTTCCTGGGGAATA
ACTGA

SEQ ID NO: 17

ДНК

Род/вид- *Staphylococcus aureus*

Описательное название- добавлена последовательность SaPAMb2
ATGACCGGCCTGGCCGAGGCGATCGCGAATACCGTCCAGGCGGCCAGCAGCACGACAGCGTCA
AGCTGGG

CACSTCGATCGTGGACATCGTCGCCAACGGCGTGGGCCTGCTGGGCAAACCTCTTCGGCTTCTGA

SEQ ID NO: 18

ДНК

Род/вид- *Staphylococcus epidermidis*

Описательное название - добавлена последовательность SePSMa
ATGGCGGACGTCATCGCCAAGATCGTCGAGATCGTGAAGGGCCTGATCGACCAGTTCACCCAGA
AGTGA

SEQ ID NO: 19

ДНК

Род/вид- Levivirus MS2

Описательное название- добавлена последовательность L MS2

ATGGAGACCCGGTTCCTCGCAGCAGTCCCAGCAAACCCCGGCCAGCACCAACCGCCGCCGCCCT
TCAAGCA
CGAGGACTACCCGTGCCGCCGGCAGCAGCGCAGCTCCACCCTGTACGTGCTGATCTTCCTGGCG
ATCTTCCT
GAGCAAGTTCACCAACCAGCTGCTGCTGTCCCTGCTGGAGGCGGTCATCCGGACCGTCACCACC
CTGCAGCA
GCTGCTGACCTGA

SEQ ID NO:20

ДНК

Род/вид- Levivirus PRR1

Описательное название- добавлена последовательность L PRR1

ATGTGCAAGGTGTCTACTAAGGTAGACTCTAAACTGACTGAGTCAGTTGGACAACTCACCATAA
GGAGCTAC
CTATGGCTACGGAATATCCTAGCATTAGCAGGACTTCTTTTCGTAATCCTTCTTGCGACCAATC
ATTTATCCA
TCGCTATCTACAGTCCGTAA

SEQ ID NO:21

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - промотор gp32 (P₃₂) LGZ19

CGACCCTGCCCTACTCCGGCCTTAAACCCACATCCAAAAGAGAGAGAATCGC

SEQ ID NO:22

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - терминатор gp32 (T₃₂) LGZ19

TGCCACGAAACCCCGCACTTCGGTGTGGGGTTTCTTCAAAGCCTAACGACCCGCGCAGATTCCC
TGCGTGGG
TTTTTGCGCTTTAGGAGAAACCCT

SEQ ID NO:23

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - область gp7 LUZ19 дикого типа

TACAAGGTGGTGGCACCCAGCTCGGCGGAAGGTATCATTGTGCTGGCGACCAAGCAGACGCCGG
CGCTAGC

CCAAGCAGCCGTCGTACTGCACAGCATGAACCCTGCGCAGTATCCCGCAGGTTCCGGCTATCCTC
AACACGGC

CTGGAAGTGCCGCCGCTGGGAGTGGGCGAGTACGTCAAGCTCGTCCAAGGGGAGGAGGAC

SEQ ID NO:24

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название- область gp18 LUZ19 дикого типа

GAATGCCAACCGAAGAAGAACGCATGATCCGCTGTTTACTGGCGGATATCCACGAGCCACTGGA
CCTGCTGT

TCCCCGGCCTCCGTACCAAGGCCCATATGGACCCGCAAGCAGAGGAACTGTCGATTCTGAATTGA
CTACGACC

ATGCGAAGCTGGGCCGTATGGGATTCTGCCACGCGGTATCCCTATATCAACTGTCCATATATGG
CCGCGAGG

GGATGGTCCGCTACCTGATGCAGGAGATTCCCCGCCGCGTGCTGGAAGGTCTGCTGGTCAAGGC
GCAGCAGT

ACAGCCAAAGCAACTGGTACAGCAAATGACGAC

SEQ ID NO:25

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - gp49 и межгенная область gp48-gp49
LUZ19 дикого типа

GGGGACACCATGAGCAAAGCCAAACTACGAGTCATCGCCGACACCCCGGAGCTGGAGTCAGTGC
TAAAAGC

ATTGCTGACCGCCACCTACGCTATCGAGGACCTGCTCAACGAGGCCGTGGCTAGCAAGGTGCTA
AACTCCCG

CCTGGGCTGGTCCGCAGTCGGCGAGTATGTCGAACTGTTCAACCGCACGCAATCCCGCGTGCC
GGGTTGAT

TCCCGAGTAG

SEQ ID NO:26

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LKD16

Описательное название - ген gp18 LKD16 дикого типа

GTGCGAGTACCAACTGAACACGAGCGCACCCCTGCGCTGCCTGCTCCAAGACATCCACGGGCCGC
TGAATCTG
CTGTTCCCAGGTATCCGGGTGAAGGTGGAGGAGGCGTGCCTCGGATACTTGGGCTACAGGGAGC
GGGGCTA
TTGGGAGCTGCGCCTCCAGGTGGACTACGACCACCCGAAGCTTGGGCACCTCCGCTACAGTCAG
GCCGTGCC
GGAGTACGTGCTGATCAACGACCGCGACAGCATCATCAAGTACCTGATGGAAGCAGTCCCTCGG
CAGGTAC
TAGAGGGCATGCTCAATAAGGCCCAGGAATTCGTAACCAAGAACTGGTATTCCCTATGA

SEQ ID NO:27

ДНК

Синтетический (искусственный/неизвестный)

Описательное название - ген, кодирующий NLS-FLAG-CAS9-His
ATGCCCAAGAAAAAGCGGAAGGTCGGCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTTGGAGCCTGGAG
AGAAGC
CCTACAAATGCCCTGAGTGCGGAAAGAGCTTCAGCCAATCTGGAGCCTTGACCCGGCATCAACG
AACGCAT
ACACGAGACAAGAAGTACTCCATCGGGCTGGACATCGGGACGAACTCCGTGGGATGGGCCGTGA
TCACAGA
CGAATACAAGGTGCCTTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGGAACACGGACAGACACTCCATCAAG
AAGAACC
TCATCGGGGCCTTGCTCTTCGACTCCGGAGAAACCGCCGAAGCAACGCGATTGAAAAGAACCGC
CAGAAGA
CGATACACACGACGGAAGAACCGCATCTGCTACCTCCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCA
AGGTGGA
CGACTCGTTCTTTCATCGCCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAAGACAAGAAACATGAGCGC
CACCCGA
TCTTCGGGAACATCGTGGACGAAGTGGCCTACCACGAGAAATACCCACGATCTACCACTTGCG
CAAGAAA
CTCGTGGACTCCACGGACAAAGCGGACTTGCGGTTGATCTACTTGGCCTTGGCCCACATGATCA
AATTTCTGG
GGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACTTGAATCCCGACAATTCCGACGTGGACAAGCTCTTCATCC
AGCTGGTG
CAGACCTACAACCAGCTCTTCGAGGAGAACCCCATCAATGCCTCCGGAGTGGACGCCAAAGCCA
TCTTGTC

GCCCGATTGTCCAAATCCAGACGCTTGGAGAACTTGATCGCACAACTTCCTGGCGAGAAGAAGA
ACGGCCT
CTTCGGCAACTTGATCGCGCTGTCGCTGGGATTGACGCCTAACTTCAAGTCCAACCTTCGACTTG
GCCGAGGA
CGCCAAGTTGCAACTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTCGACAACCTGCTGGCCCCAAATT
GGCGACC
AATACGCGGACTTGTTTTTGGCGGCCAAGAACTTGAGCGACGCCATCTTGTTGAGCGACATCTT
GCGCGTGA
ATACGGAGATCACCAAAGCCCCCTTGTCCGCCTCTATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCA
AGACTTGA
CCCTGTTGAAAGCCCTCGTGCGGCAACAATTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCA
GTCCAAGA
ACGGGTACGCCGGCTACATCGACGGAGGAGCCTCCCAAGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCC
CATCCTG
GAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGTTGCTCGTGAAGCTGAACCGCGAAGACTTGTTGCGAAAAC
AGCGGAC
GTTGACAAATGGCAGCATCCCCACCAAATCCATTTGGGAGAGTTGCACGCCATCTTGCGACGG
CAAGAGG
ACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACCGCGAGAAAATCGAGAAGATCCTGACGTTTCAGAATCCC
CTACTACG
TGGGACCCTTGGCCCCGAGGCAATTCCCGGTTTGTCATGGATGACGCGCAAAAGCGAAGAGACGAT
CACCCCC
TGGAACCTTCGAAGAAGTGGTCGACAAAGGAGCATCCGCACAGAGCTTCATCGAGCGAATGACGA
ACTTCGA
CAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGTTGCCCAAGCATTCGCTGCTGTACGAGTACTTCACGGTG
TACAACGA
GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGCAAACCCGCGTTCTGTGCGGAGAGCAA
AAGAAGG
CCATTGTGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAACAGCTGAAAGAGGACTA
CTTCAAG
AAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGATTCAATGCCTCCTTGG
GAACCTAC
CATGACCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCC
TGGAGGA
CATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGAGAGATGATCGAGGAACGGTTGAAAACGTAC

GCCCCACTT
GTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAACGCCGCCGCTACACCGGATGGGGACGATTGAGC
CGCAAAC
TGATTAATGGAATTCGCGACAAGCAATCCGGAAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGG
GTTTCGCCA
ACCGCAACTTCATGCAGCTCATCCACGACGACTCCTTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGC
CCAAGTGT
CCGGACAAGGAGACTCCTTGACGAGCACATCGCCAATTTGGCCGGATCCCCCGCAATCAAAAA
AGGCATC
TTGCAAACCGTGAAAGTGGTCGACGAACTGGTGAAGGTGATGGGACGGCACAAGCCCGAGAACA
TCGTGAT
CGAAATGGCCCGCGAGAACCACCAACCCAAAAAGGACAGAAGAACTCCCGAGAGCGCATGAAG
CGGATC
GAAGAGGGCATCAAGGAGTTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCATCCCGTGGAAGAATACCCAAT
TGCAAAA
CGAGAAGCTCTACCTCTACTACCTCCAGAACGGGCGGGACATGTACGTCGACCAAGAGCTGGAC
ATCAACC
GCCTCTCCGACTACGATGTGGATCATATTGTGCCCCAGAGCTTCCTCAAGGACGACAGCATCGA
CAACAAGG
TCCTGACGCGCAGCGACAAGAACCGGGGCAAGTCTGACAATGTGCCTTCCGAAGAAGTCGTGAA
GAAGATG
AAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTCAACGCCAAGCTCATCACCCAACGGAAGTTCGACAACCTGA
CCAAGGC
CGAGAGAGGAGGATTGTCCGAGTTGGACAAAGCCGGCTTCATTAAACGCCAACTCGTGGAGACC
CGCCAGA
TCACGAAGCACGTGGCCCAAATCTTGGACTCCCGGATGAACACGAAATACGACGAGAATGACAA
GCTGATC
CGCGAGGTGAAGGTGATCACGCTGAAGTCCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGT
TCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACCTACCATCACGCCCATGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTCGGAACC
GCCCTGA
TCAAGAAATACCCCAAGCTGGAGTCCGAATTCGTGTACGGAGATTACAAGGTCTACGACGTGCG
GAAGATG
ATCGCGAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAAGCCACCGCCAAGTACTTCTTTTACTCCAACATCA
TGAACTTC

TTCAAGACCGAGATCACGCTCGCCAACGGCGAGATCCGCAAGCGCCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGAC
GGGAGAGATTGTGTGGGACAAAGGAAGAGATTTTGCCACAGTGCGCAAGGTGCTGTCCATGCCT
CAGGTGA
ACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAAACAGGAGGGTTTTCCAAAGAGTCCATTTTGCCTAAGAG
GAATTCC
GACAAGCTCATCGCCCGCAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGGGGCTTCGACTCCCCCA
CGGTGGC
CTACTCCGTGTTGGTGGTGGCCAAAGTGGAGAAAGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTGAAG
GAGTTGC
TCGGAATCACGATCATGGAACGATCGTCGTTTCGAGAAAAACCCCATCGACTTCCTCGAAGCCAA
AGGGTAC
AAAGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACG
GCCGCAA
GCGGATGCTGGCCTCCGCCGGGGAAGTGCAGAAAGGGAACGAATTGGCCTTGCCCTCCAAATAC
GTGAACT
TCCTCTACTTGGCCTCCCATTTACGAAAAGCTCAAAGGATCCCCTGAGGACAATGAGCAGAAGCA
ACTCTTCG
TGGAACAACACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGCGCGT
GATCCTC
GCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTCTCCGCCTACAACAAGCACCGCGACAAGCCTATCCGCG
AGCAAGC
CGAGAATATCATTCACCTGTTTACCCTGACGAATTTGGGAGCCCCTGCCGCCTTTAAATACTTT
GACACCACC
ATCGACCGCAAAAGATACACCTCCACCAAGGAAGTCTTGGACGCCACCCTCATCCACCAGTCCA
TCACGGGC
CTCTACGAGACGCGCATCGACCTCTCCCAATTGGGCGGCGACCATCATCACCACCACCACTAA

SEQ ID NO:28

ДНК

Род/вид - Inovirus M13MP18

Описательное название - заменена область M13MP18 дикого типа

ATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATG
CAAGCTTG
GCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCC
TTGCAGCA

CATCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGT
TGCGCAGC
CTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGG
AGTGCGA
TCTTCCTGAGGCCGATACGGTCGTCTGTCCTCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCC
ATCTACAC
CAACGTAACCTATCCCATTTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTGT
TACTCGCTC
ACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTC
CTATTGGT
TAA

SEQ ID NO:29

ДНК

Неизвестный/искусственный - коммерчески доступный из DNA2.0

Описательное название - последовательность паприка

ATGGTGTCAAAGGGAGAAGAACTGATCAAAGAGAATATGAGGATGAACTCTACATGGAAGGAA
CTGTGA
ACAACCACCATTTCAAGTGCACGAGCGAGGGTGAAGGGAAACCTTACGAAGGTACCCAGACCAT
GCGGATT
AAGGTCGTCTGAAGGAGGACCACTCCCCTTCGCATTCGACATCCTGGCCACTTCCTTCATGTACG
GGTCGCGC
ACTTTCATCAAGTACCCAAAAGGGATCCCCGACTTCTTCAAGCAGTCCTTTCCGGAGGGATTCA
CTTGGGAA
CGCGTCACTAGATACGAGGATGGCGGAGTGGTCACCGTGATGCAAGACACCTCTTTGGAAGATG
GATGCCT
GGTGTACCACGTGCAAGTCAGAGGAGTGAACCTTCCGAGCAATGGGCCGGTGATGCAGAAGAAA
ACCAAGG
GCTGGGAACCGAACACCGAAATGCTGTATCCAGCAGACGGAGGCTTGGAGGGCCGGTCCGACAT
GGCTCTG
AAGCTTGTTGGAGGAGGACATCTGTCCTGCTCGTTCGTGACGACCTACCGGAGCAAGAAGCCGG
CGAAAAA
CCTTAAGATGCCGGGGATCCACGCGGTGGATCATCGCCTGGAAAGGCTCGAGGAGTCAGACAAC
GAGATGT
TTGTCGTGCAACGCGAGCACGCCGTGGCCCGCTACTGTGATCTCCCTTCAAAGCTGGGCCACAA
GCTGAATT

CCGGCCTCCGGTCGAGAGCCCAGGCTTCGAATTCAGCCGTGGACGGAAGTGCGGGGCCCTGGTTC
GACCGGA
AGCCGATGA

SEQ ID NO:30

ДНК

Род/вид- *Lambdavirus* лямбда

Описательное название - последовательность *ell* фага X дикого
типа *E. coli*

ATGGTTTCGTGCAAACAAACGCAACGAGGCTCTACGAATCGAGAGTGC GTTGCTTAACAAAATCG
CAATGCTT
GGAAGTGAAGACAGCGGAAGCTGTGGGCGTTGATAAGTCGCAGATCAGCAGGTGGAAGAGGG
ACTGGA
TTCCAAAGTTCTCAATGCTGCTTGCTGTTCTTGAATGGGGGGTCGTTGACGACGACATGGCTCG
ATTGGCGC
GACAAGTTGCTGCGATTCTCACCAATAAAAAACGCCCGGCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAAT
CCAGATG
GAGTTCTGA

SEQ ID NO:31

Белок

Синтетический (искусственный/неизвестный)

Описательное название - белок NLS-FLAG-CAS9-His,
транслируемый из SEQ ID NO: 27

MPKKKRKVG DYKDDDDKLEPG EKPYKCPECGKSFSQSGALTRHQ RTHTRDKKYSIGLDIGTNSV
GWAVITDEYK
VPSKKFKVLGNTDRHS IKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNE
AKVDDDSFFHRLE
ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR LIYLALAHMIKFRG
HFLIEGDLNPDN
SDVDKLF IQLVQTYNQ LFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPG EKKNGLFGNLI
ALSLGLTPNF KSN
FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSA
SMIKRYDEHHQ
DLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN
REDLLRKQRTFD
NGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAMWTRKSE

ETITPWNFEEVVD

KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKA
IVDLLFKTNR

KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL
TLTLFEDREMIEE

RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIH
DDSLTFKEDIQ

KAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHHPENIVIVEMARENQTTQKG
QKNSRERMKR

IEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
KDDSIDNKVLTR

SDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVE
TRQITKHVA

QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIKYPKLESE

FVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE
IVWDKGRDFATV

RKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVA
KVEKGKSKKL

KSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQ
KGNELALPSKYV

NFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKH
RDKPIREQAENII

HLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDHHHHHH

SEQ ID NO:32

ДНК

Род/вид - цитомегаловирус ЦМВЧ

Описательное название - фрагмент RL13 ЦМВЧ после
редактирования

ATGGACTGGCGATTTACGGTTACGTGGACGATACTAATGTCCGCGTTGTCAGAAAGCTGCAATC
AAACCTGT

TCTTGTCAATGTCCCTGTAGTACTACCGTTAACTATTCAACTAGTACTGAGACAGCCACATCAA
CATAACAGTA

CAACAGTTATCAGCAATAAAAGCACTTCAGAATCTATAAATTGCTCTACTGCAACTACACCAGC
AAACACCG

TTTCTACAAAACCGTCGGAAACAACCACACAGATATCCACAACGACGAACACAAACGTTGAGAC
TACCACA
TGTACCAACACCACCACGACCGTTACTTGTGATGGTTTCAATTATACAGTCCATAAAAGATGCG
ATCGCAGT
TACGAGGTAATCAACGTAACAGGATACGTTGGTAGCAACATAACTCTAAAAAATGCAATCAGA
CTGAGAA
ATGGCACAATGTAGACTGGATTCAATTATGAGTACCCACGCATAAAATGTGCGAATTAGGCAAC
TATCACCA
AACCACACCACGGCACGACATATGTTTTGACTGCAACGACACCTCCCTAACTATCTACAACCTA
ACCACAAA
AAACGCTGGAAAATATACCAGGCGTCACCGTGATAACGGTCAAGAAGAAAATTACTACGTAACG
GTGTTAA
TTGGAGACACAACGTTATTCACTCTTGGCACATGCCCTGTAAGATATAAAGAATCTACGAACAC
TGAAAACA
CCATTGGAAGTAGCATCATAGAAACCATTGAGAAAGCTAACATTCCCCTGGGAATTCATGCTGT
ATGGGCGAG
GCGTAGTGGTATCAGTGGCGCTTATAGCGTTGTACATGGGTAGCCATCGCATTCCTCAAAAAGCC
GCATTACA
CCAAACTTCCCAAATATGATCCAGATGAATTTTGGACTAAGGCTTAA

SEQ ID NO:33

ДНК

Род/вид - цитомегаловирус ЦМВЧ

Описательное название - предварительное редактирование
фрагмента RL13 ЦМВЧ

ATGGACTGGCGATTTACGGTTACGTGGACCGTTACTTGTGATGGTTTCAATTATACAGTCCATA
AAAGATGC
GATCGCAGTTACGAGGTAATCAACGTAACAGGATACGTTGGTAGCAACATAACTCTAAAAAAT
GCAATCA
GACTGAGAAATGGCACAATGTAGACTGGATTCAATTATGAGTACCCACGCATAAAATGTGCGAA
TTAGGCA
ACTATCACCAAACCACACCACGGCACGACATATGTTTTGACTGCAACGACACCTCCCTAACTAT
CTACAACCT
TAACCACAAAAAACGCTGGAAAATATACCAGGCGTCACCGTGATAACGGTCAAGAAGAAAATTA
CTACGTA
ACGGTGTTAATTGGAGACACAACGTTATTCACTCTTGGCACATGCCCTGTAAGATATAAAGAAT

CTACGAAC

ACTGAAAACACCATTGGAAGTAGCATCATAGAAACCATTGAGAAAGCTAACATTCCCCTGGGAA
TTCATGCT

GTATGGGCAGGCGTAGTGGTATCAGTGGCGCTTATAGCGTTGTACATGGGTAGCCATCGCATTC
CCAAAAAG

CCGCATTACACCAAACCTCCCAAATATGATCCAGATGAATTTTGGACTAAGGCTTAA

SEQ ID NO:34

Белок

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - последовательность белка Gp13 LUZ19
дикого типа

MLALGAFDLSGLMVGSCLVVGELKALCVDDRHSRQGIGAELVRAAELAGAEYLTCFEFLEPFY
ADLGWSTTH

REANWTAGEPDVLHMRAPGHDV

SEQ ID NO:35

Белок

Род/вид- PMkmvlikevirus LUZ19

Описательное название - последовательность белка Gp38 LUZ19
дикого типа

MARFKNPETIHVADGVEAVFSLDFPFLRREDVFVQVDKILVTDYTWVDDTNIQLAVVPKKDQEV
RIFRDTPAQVP

DTQFSQDIPFLPRYIDANNKQLLYAVQEGINTANLALDGVLDAIRIAEEARRLAQEALDAANEA
LRRALGFAEIRT

VTEDSDIDPSWRGYWNRCTADKPLTLTMQMEDPDAPWVEFSEVHFEQAGVRDLNIVAGPGVTI
NRLQNTTMQL

YGENGVCTLKRLGANHWHIWGAMEDE

SEQ ID NO:36

Белок

Род/вид- PMkmvlikevirus LUZ19

Описательное название - последовательность белка Gp40 LUZ19
дикого типа

MFKTEVKGRYTLIRRKADGTPVETLEFDNIITNAGLDWIAAMDTDLMGEPVAVSTSTADPNPSA
PAIPEVVQRTS

ASAPGGGTTSGLDGEWLFWRRRWRFPQGTLAGQVLATVGLICNSDRRFESNTGELIPKDTPLSY
TRIKDAAGQPT

TLVVAADEILDVQYEFRRSRPVGTAETAKFVISGVERTFRLIPKPFANRANLSGERYIFYNTNPYI
 NGKDASGGNVRD
 GQWQKKYPKYVRGSYKAQITLLAQVQNGNMAGGITGTEELQIYNGRNYVLDINPPVKNNTQEF
 TVTLEFTVAR

A

SEQ ID NO:37

Белок

Род/вид- *Pseudomonas aeruginosa*

Описательное название - последовательность белка PyoS5

MSNDNEVPGSMVIVAQGPDDQYAYEVPPIDSAVAGNMFGDLIQREIYLLQKNIIYPVRSIFEQG
 TKEKKEINKKV
 SDQVDGLLKQITQGKREATRQERVDMMSAVLHKMESDLEGYKKTFTKGPFDIYEKQSSLSIYEA
 WVKIWEKNSW
 EERKKYPFQQLVRDELERAVAYYKQDSLSEAVKVLRLQELNKQKALKEKEDLSQLERDYRTRKAN
 LEMKVQSEL
 DQAGSALPPLVSPTPEQWLERATRLVTQAIADKKQLQTTNNTLIKNSPTPLEKQKAIYNGELLV
 DEIASLQARLVK
 LNAETTRRRTEAERKAAEEQALQDAIKFTADFYKEVTEKFGARTSEMARQLAEGARGKNIRSSA
 EAIKSFEKHKD
 ALNKKLSLKDRQAIKAFDSLQMMMAKSLEKFSKGFVVGKAIDAASLYQEFKISTETGDWKP
 FFVKIETLAA
 GAAASWLVGIAFATATATPIGILGFALVMAVTGAMIDEDLLEKANNLVISI

SEQ ID NO:38

Белок

Род/вид- PMkmvlikevirus LKD16

Описательное название - последовательность белка Gp18 LKD16

MRVPTENHERTLRCLLQDIHGPLNLLFPGIRVKVEEACLGYLGYRERGYWELRLQVDYDHPKLGH
 LRYSQAVPEY
 VLINDRDSIIKYLMEAVPRQVLEGMLNKAQEFVTKNWYSL

SEQ ID NO:39

Белок

Род/вид- PMkmvlikevirus LKA1

Описательное название - последовательность белка Gp49 LKA1

MAQTPSTWADYVGDGVEDTFQVTFPYQKQQEVFVTVGGDPAAFTFISAGWIQLAAVPVNGAAIR
 VRRSTEAFFP

RHEFANGVPLLPRFIDENNTQFLYTVQEAVNETHGIASEALSVAEEARGIAQAASDKVDAATID
 SAHQLRLDLAD
 PAKGPGLLGYDRDVSYPVGSVGQSLQFLEMGRVTPAQFGAVGDGASHPLSERYATLAEAQTVYP
 HAVALSDEID
 WAALQAAVDSGAPVHIPSGDYQINRGISSTGSLQIAGDGATSIIRPTAAFTGTSVLSCVGSLSVA
 LPNISSVSAGSLTI
 DFASTPNLVAGDVFIIYNPTDSSFSGFRTSYRAGEFCEVRAVSGNTVTIRSALYAAAYDGATVAI
 YKVVSQVVDIASI
 QIVGGTVPMNGLLVEAVVSPRVDDVTVTLANNAGVYFARCYDAKITNSNISNIGDGGDDYGIIF
 GNCHDGGADN
 CKVYARRHAIATGGDAEVGCVPRNVRMRNCTLRNDITSGTHCADFHGNAEDCSYENCTIYGGA
 TWQKDISY
 RHCTITNASGGWIVISAEILGGTFLLDQCTLYTTGDPQPGNRGVIDVGGNSAVLTTNTTQPCNF
 LIQGGSLRAPSL
 TSSYLLRARLEGSTVPVNIQYSGQAIDVGS LGKVLQLDITSGSTSPEYLIVENLAGLPSGITLA
 SAAGGFASAPMRM
 PVLGGRVQVTTATNASSVTAPVTFRYIYPKAPTQVTKTDRSYAGNRVGVAIANPTSASGATLG
 LFTDDGTNFSS
 AVTNQLNWQAGIYEV

SEQ ID NO:40

Белок

Род/вид- PMkmvlikevirus NTUH-K2044-K1-1

Описательное название - последовательность белка Gp34 NTUH-K2044-K1-1

MALIRLVAPERVFSDLASMVAYPNFQVQDKITLLGSAGGDFTFTTTASVVDNGTVFAVPGGYLL
 RKFVGPAYSS
 WFSNWTGIVTFMSAPNRHLVVDTVLQATSVLNKSNSTLEFTDTGRILPDAAVARQVLNITGSA
 PSWVPLAADA
 AAGSKVITVAAGALSAVKGTLYLRSNKLCDGGPNTYGVKISQIRKVVGSTSGGVTSIRLDKA
 LHYNYYLSDA
 AEVGIPTMVENVTLVSPYINEFGYDDLNRFFTSGISANFAADLHIQDGVIIIGNKRPGASDIEGR
 SAIKFNNCVDSTV
 KGTCFYNIGWYGVEVLGCSEDETVHDIHAMDVRHAISLNWQSTADGDKWGEPIEFLGVNCEAYS
 TTQAGFDTH
 DIGKRVKFRVCVSYDSADDGFQARTNGVEYLNCRAYRAAMDGFASNTGVAFPFIYRECLAYDNVR

SGFNCSYGG

GYVYDCEAHGSQNGVRINGGRVKGGRYTRNSSSHIFVTKDVAETAQTSLEIDGVSMRYDGTGRA
VYFHGTVGID

PTLVSMSNNDMTGHGLFWALLSGYTVQPTPPRMSRNLLDDTGIRGVATLVAGEATVNARVRGNF
GSVANSFKW

VSEVKLTRLTFFSSAGALTVTSVAQNQDVPTPNPDLNSFVIRSSNAADVSQVAWEVYL

SEQ ID NO:41

Белок

Род/вид - T7-подобный Pp15

Описательное название - последовательность белка Gp44 Pp15

MARTIVQNALTGGQQDFEVPFDYILQRFVKLTLLIGDGNRQELVLGTDFFRFIGPRTVVRTNVFWGP
AQGYTSIEIRRV

TSASDRRVEFSDGSILTAGDLNIAQLQAIHIAEEARDSATENLSPDADGNVDARGARIYNLGDA
VQPKDAVNRYT

LDLAIAAALAMNTGNPNNAQNISYTPNGPGQSIRSVEGRLRDAVFVSDYMTTPRDGVTSNQQDL
EKALAAANAK

GADLFWPDDIPFFSTSPALIHAVYHVGRGVINANGTLFYVNPKNQHNRLHVSPPGGTGDGLAA
GRPLGTIWSAL

AALNMRAPLTTRWSLEMTAGAYNEAVTLPNYLTSCNDYLAFNWPNTGQERMEPTAYPSALDGTG
QTGLTGFHT

GIGNRITINNVCMNWDYLTALPTQQVRRAFVVGAYSTAYVNCFAFIYNGIASVSVLPGGTAIV
TGGIVDGGFRFG

LDNTGGRLSLTATKSNYTQVRNCLEYGLYSKHDASTVMDNTEFRNCGNHPPAAVAYGAAIFAYKF
NCSVDTRGV

KFYGNNAIQHCRGGITSDNPGDPDIYGTGADANKRLFLCTGGGSDDIQFYEARVMDITKRTGG
GSTTASVSSLL

LAAVASVRKGYFAHNDQVIRMTLMFRATGSAGIFTPTLRTPLGTIPLGSFRVASGQYGEIKLTI
RPTLTSDGLIVGF

SCINAVQNLGSSVGQIIIVSGTVDLRTVDQLVEMWGYSEAGGTASYIQGLIELVG

SEQ ID NO:42

Белок

Род/вид - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Описательное название - последовательность белка DspB

MNCCVKGNSTYPQKTSTKQTGI.MI,DTARHFYSPF.VTKSFTDTSLSGGNFI.HI,HFSDHF
.NYATF.SHI,1,NQRAF.NAV

QKGDGIYINPYTGKPFSLSYRQLDDIKAYAKAKGIELIPELDSPNHMTAIFKLVQKDRGVKYLQG
 LKSRQVDDEIDI
 TNADSITFMQSLMSEVIDIFGDTSQHFHIGGDEFGYSVESNHEFITANKLSYFLEKKGLKTRM
 WNDGLIKNTFEQI
 NPNIEITYWSYDGDGTQDKNEAAERRDMRVSLPELLAKGFTVLNYSYLYIVPKASPTFSQDAA
 FAAKDVIKNW
 DLGVWDGRNTKNRVQNTHEIAGAALSIWGEDAKALKDETIQKNTKSLLEAVIHKTNGDE

SEQ ID NO:43

Белок

Род/вид- *Staphylococcus aureus*

Описательное название - последовательность белка SaPSMa3

MEFVAKLFKFFKDLLGKFLGNN

SEQ ID NO:44

Белок

Род/вид- *Staphylococcus aureus*

Описательное название - последовательность белка SaPAMb2

MTGLAEAIANTVQAAQQHDSVKLGTSIVDIVANGVGLLGKLFGE

SEQ ID NO:45

Белок

Род/вид- *Staphylococcus epidermidis*

Описательное название - последовательность белка SEPSMa

MADVIAKIVEIVKGLIDQFTQK

SEQ ID NO:46

Белок

Род/вид- *Levivirus MS2*

Описательное название - последовательность белка L MS2

METRFPQQSQQTPASTNRRRPFKHEDYPCRRQQRSSTLYVLIFLAIFLSKFTNQLLLSLLEAVI
 RTVTTLQQLLT

SEQ ID NO:47

Белок

Род/вид- *Levivirus PRR1*

Описательное название - последовательность белка L PRR1

MCKVSTKVDKSLTESVGQLTIRSYLWLRNILALAGLLFVILLATNHLISIAIYSP

SEQ ID NO:48

Белок

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - последовательность белка Gp18 LUZ19
 MRMPTEEERMIRCLLDIHEPLDLLFPGLRTKAHMDPQAEELSIRIDYDHAKLGRMGFCHAVSL
 YQLSIYGREGM
 VRYLMQEIPRRVLEGLLVKAQQYSQSNWYSK

SEQ ID NO:49

Белок

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - последовательность белка Gp49 LUZ19
 MSKAKLRVIADTPELESVLKALLTATYAIEDLLNEAVASKVLNSRLGWSAVGEYVELFNRTQSR
 VAGLIPE

SEQ ID NO:50

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - последовательность гена gp18 LUZ19
 ATGAGAATGCCAACCGAAGAAGAACGCATGATCCGCTGTTTACTGGCGGATATCCACGAGCCAC
 TGGACCT
 GCTGTTCCCCGGCCTCCGTACCAAGGCCCATATGGACCCGCAAGCAGAGGAACTGTCGATTCTGA
 ATTGACCTA
 CGACCATGCGAAGCTGGGCCGTATGGGATTCTGCCACGCGGTATCCCTATATCAACTGTCCATA
 TATGGCCG
 CGAGGGGATGGTCCGCTACCTGATGCAGGAGATTCCCCGCCGCGTGCTGGAAGGTCTGCTGGTC
 AAGGCGC
 AGCAGTACAGCCAAAGCAACTGGTACAGCAAATGA

SEQ ID NO:51

ДНК

Род/вид- Phikmvlikevirus LUZ19

Описательное название - последовательность белка Gp49 LUZ19
 ATGAGCAAAGCCAAACTACGAGTCATCGCCGACACCCCGGAGCTGGAGTCAGTGCTAAAAGCAT
 TGCTGAC
 CGCCACCTACGCTATCGAGGACCTGCTCAACGAGGCCGTGGCTAGCAAGGTGCTAAACTCCCGC
 CTGGGCTG
 GTCCGCGAGTCGGCGAGTATGTGGAAGTGTTCACCGCACGCAATCCCGCGTGGCCGGGTTGATT
 CCCGAGTA

G

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный фаг, сконструированный для экспрессии двух или более полезных нагрузок, где по меньшей мере одна полезная нагрузка представляет собой экзополисахаридную (ЭПС) деполимеразу.

2. Рекомбинантный фаг по п.1, в котором одна из полезных нагрузок представляет собой ДНКазу или один или более поверхностно-активных фенол-растворимых модулинов.

3. Рекомбинантный фаг по п.1 или 2, причем рекомбинантный фаг показывает улучшенный круг хозяев.

4. Рекомбинантный фаг по любому из пп. 1-3, в котором указанные две или более полезных нагрузок содержат ДНКазу.

5. Рекомбинантный фаг по любому из пп. 1-3, в котором указанные две или более полезных нагрузок содержат фенол-растворимый модулин.

6. Рекомбинантный фаг по любому из пп. 1-3, в котором указанные две или более полезных нагрузок содержат ДНКазу.

7. Рекомбинантный фаг по любому из пп. 1-3, в котором указанные две или более полезных нагрузок содержат ДНКазу и фенол-растворимый модулин.

8. Рекомбинантный фаг по любому из пп. 1-3, в котором указанные две или более полезных нагрузок содержат ДНКазу и один или более фенол-растворимых модулинов.

9. Рекомбинантный фаг по любому из пп. 1-3, в котором указанный фенол-растворимый модулин выбран из группы, состоящей из PSMa, PSMa3 и PSMb2.

10. Рекомбинантный фаг по п.9, в котором указанным фенол-растворимым модулином является PSMa.

11. Рекомбинантный фаг по п.9, в котором указанным фенол-растворимым модулином является PSMb2.

12. Рекомбинантный фаг по п.9, в котором указанным фенол-растворимым модулином является PSMa3.

13. Рекомбинантный фаг по любому из пп. 1-12, в котором указанный фаг представляет собой фаг, инфицирующий *Pseudomonas aeruginosa* или *E. coli*.

14. Рекомбинантный фаг по п.13, где указанный фаг представляет собой фаг ФКМV.

15. Рекомбинантный фаг по п.14, в котором указанный фаг включает вирусный геном, имеющий по меньшей мере 85% идентичности последовательности с геномом LUZ19.

16. Рекомбинантный фаг по п.15, где указанный фаг содержит вирусный геном LUZ19.

17. Рекомбинантный фаг по п.16, где указанный фаг включает:

i) одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из *gp13* C17Y, *gp18* D36Y, *gp38* D82G и I83S, и *gp40* N253D, и демонстрирует улучшенный диапазон хозяев по сравнению с LUZ19; и/или

ii) *gp18* LUZ19 дикого типа, замененный на *gp18* из вируса LKD16; и/или

iii) делецию лизина в положении 55 *gp34* (мутация *gp34*L55Δ), и указанный фаг проявляет повышенную литическую активность по сравнению с LUZ19 дикого типа.

18. Рекомбинантный фаг по п.17, где указанный фаг содержит одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из *gp13* C17Y, *gp18* D36Y, *gp38* D82G и I83S, и *gp40* N253D, и демонстрирует улучшенный диапазон хозяев по сравнению с LUZ19.

19. Рекомбинантный фаг по п.18, где указанный фаг содержит мутацию *gp13* C17Y.

20. Рекомбинантный фаг по п.18, где указанный фаг содержит мутацию *gp18* D36Y.

21. Рекомбинантный фаг по п.18, где указанный фаг содержит мутацию *gp38* D82G.

22. Рекомбинантный фаг по п.18, где указанный фаг содержит мутацию *gp38* I83S.

23. Рекомбинантный фаг по п.18, где указанный фаг содержит мутацию *gp38* I83S.

24. Рекомбинантный фаг по п.18, где указанный фаг содержит мутацию *gp40* N253D.

25. Рекомбинантный фаг по п.18, где указанный фаг содержит мутацию *gp13* C17Y, мутацию *gp18* D36Y, мутацию *gp38* D82G и I83S и мутацию *gp40* N253D.

26. Рекомбинантный фаг по п.17, где указанный фаг содержит *gp18* LUZ19 дикого типа, замененный на *gp18* из вируса LKD16.

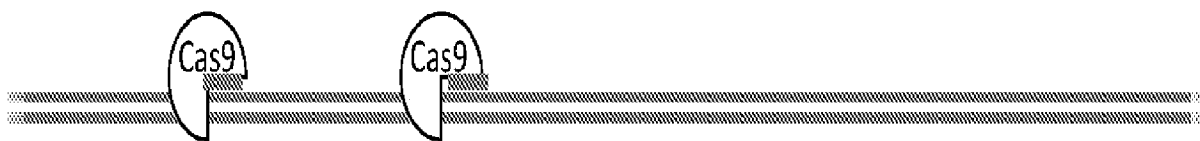
27. Рекомбинантный фаг по п.17, где указанный фаг содержит делецию лизина в положении 55 *gp34* (мутация *gp34* L55Δ), и указанный фаг проявляет повышенную литическую активность по сравнению с LUZ19 дикого типа.

По доверенности

А) Очистка вирусного генома непосредственно из вирусных частиц



Б) Сайт-специфическое расщепление очищенного вирусного генома (ДНК или РНК) с очищенной РНК-управляемой нуклеазой и нацеливающей РНК(ами)



В) Деактивация РНК-управляемой нуклеазы и необязательная очистка расщепленных продуктов с использованием фенольно-хлороформной экстракции



Г) Создание вставленного фрагмента посредством прямого синтеза ДНК/РНК, сборки множества олигонуклеотидов, выделения рекомбинантной ДНК (такой как плазмиды), или ПЦР-амплификации из матрицы

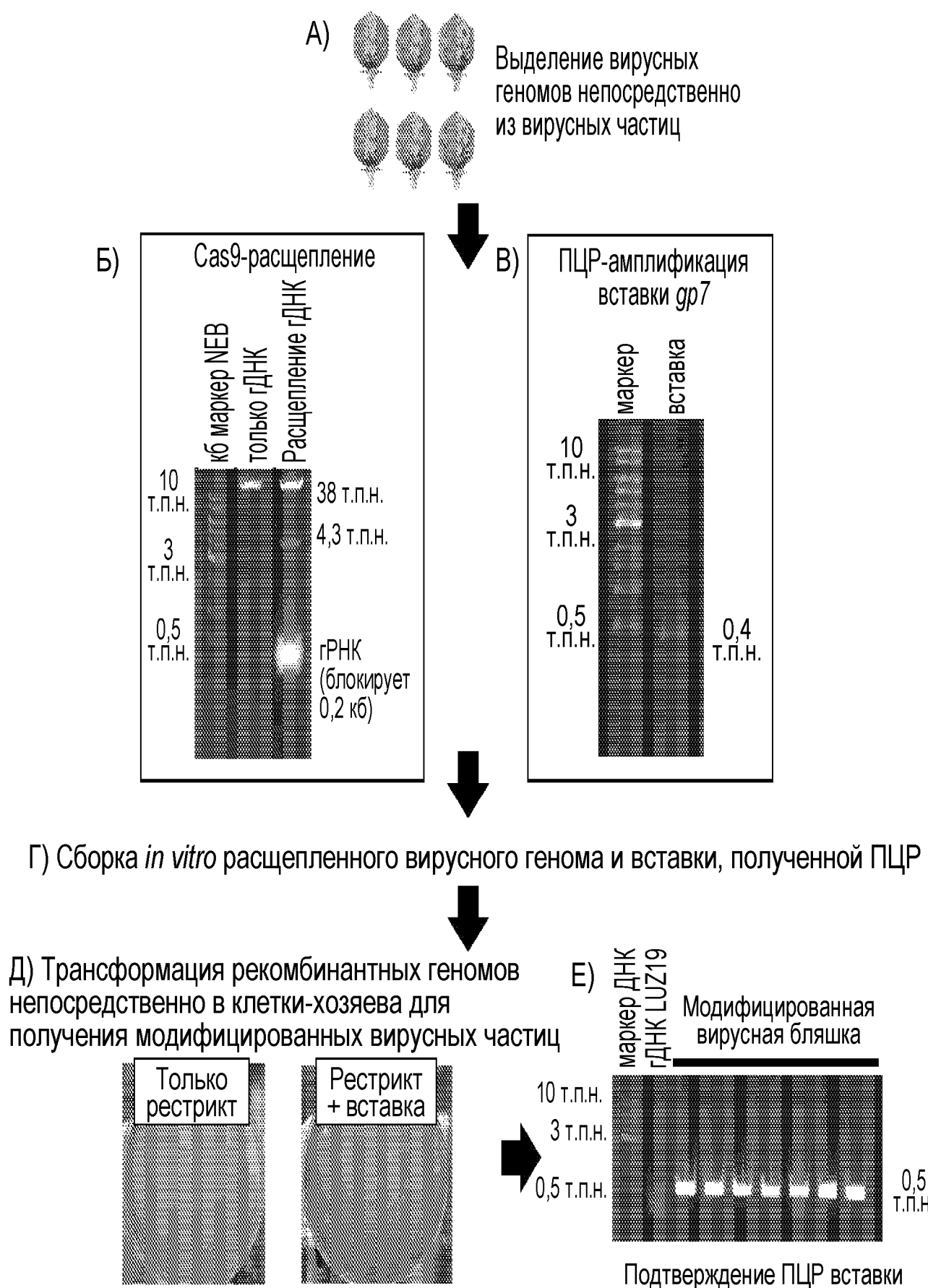


Д) Сборка *in vitro* геномных фрагментов с использованием методик *in vitro*, таких как, но без ограничений, сборка Гибсона, SLIC, лигирование и др.



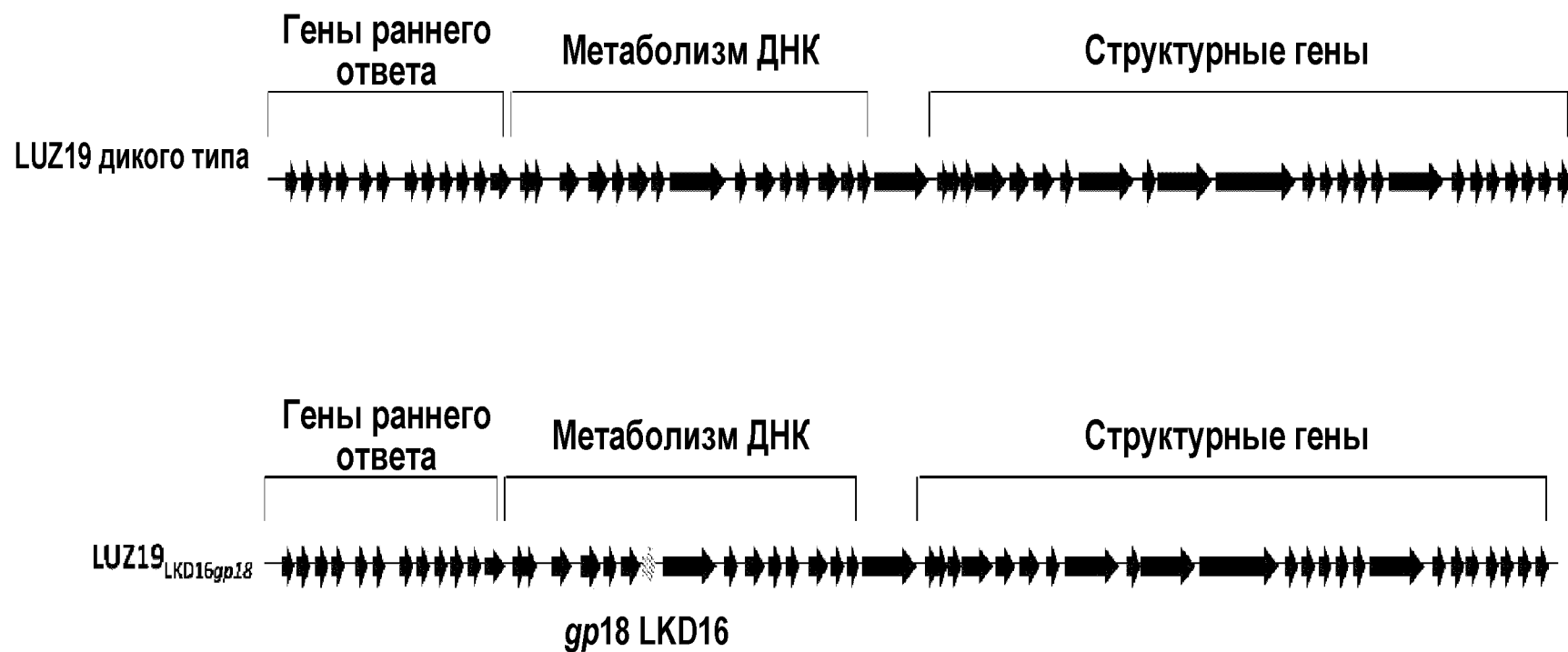
Е) Трансформация рекомбинантного генома непосредственно в клетки хозяина для образования функциональных вирусных частиц



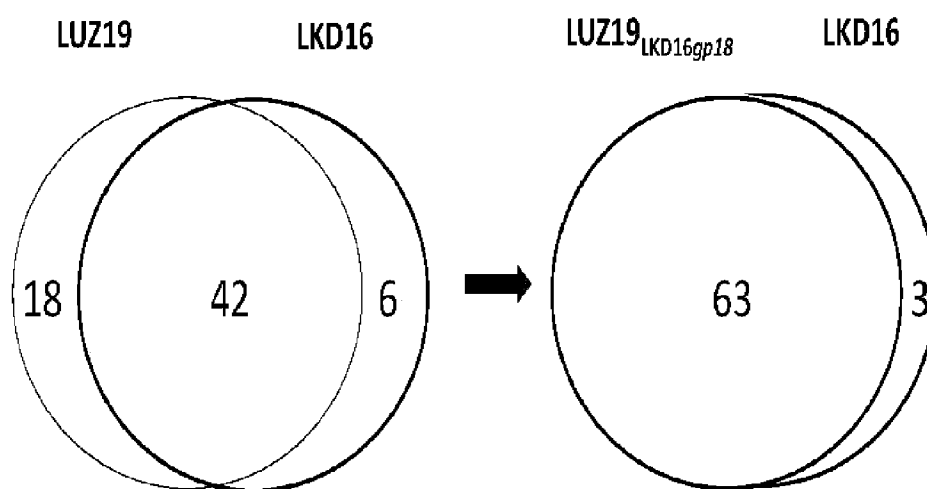


ФИГ.2А-2Е

A) LUZ19 дикого типа и модифицированный *in vitro* геном LUZ19, содержащий ген *gp18* из вируса LKD16



Б) Круг хозяев фагов LUZ19, LKD16 и LUZ19_{LKD16gp18}

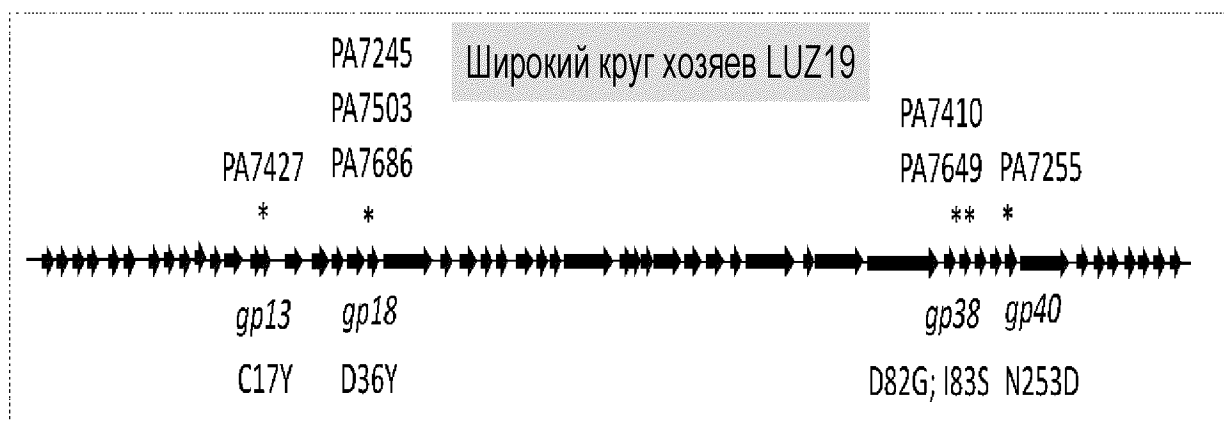


ФИГ.3Б

А)



Б)

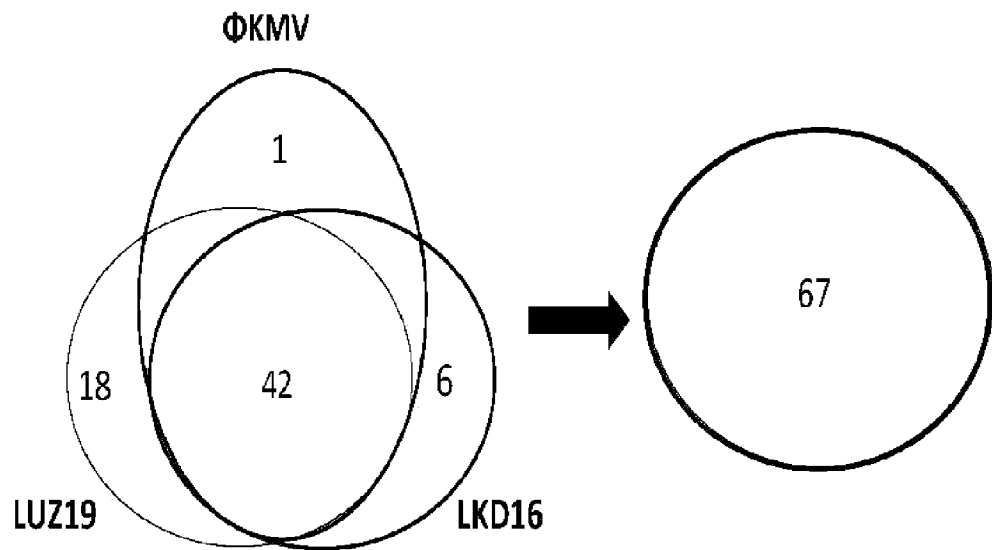


ФИГ.4А-4Б

В)

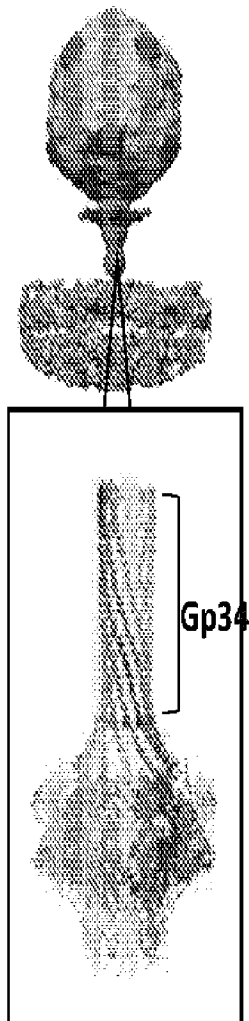
Круг хозяев рода фагов Phi-KMV
среди штаммов *P. aeruginosa*
клинической библиотеки

Широкий круг хозяев
LUZ19 (ШКХ LUZ19)

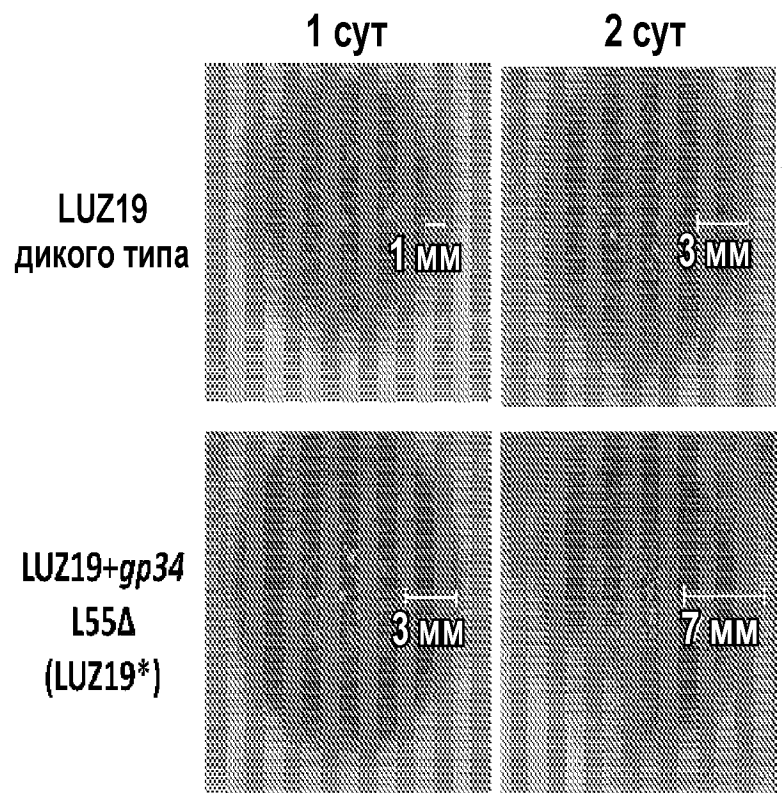


ФИГ.4В

А) LUZ19

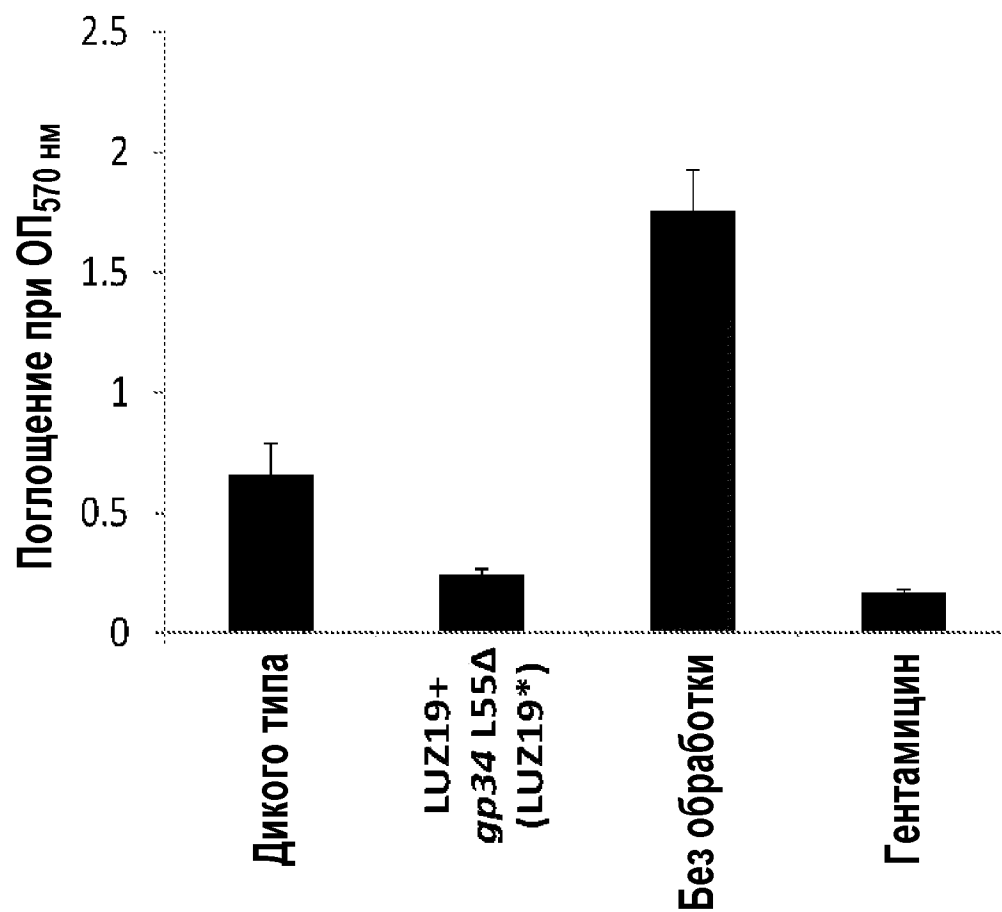


Б) Анализ бляшкообразования в двойном агаровом слое

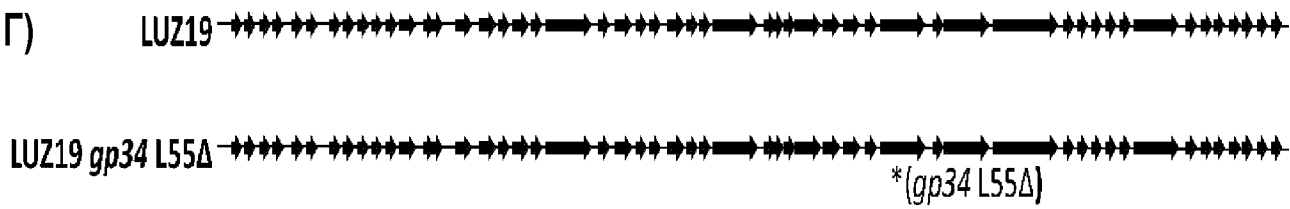


ФИГ.5А-5Б

В) Анализ биопленки с окрашиванием
кристаллическим фиолетовым



ФИГ.5В

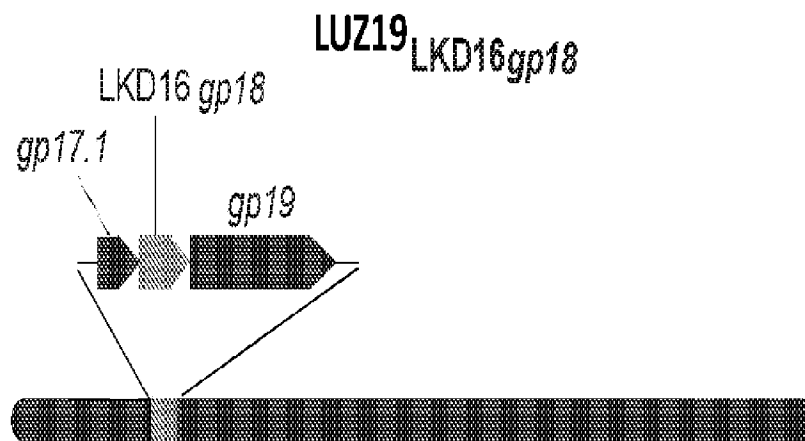


Д)

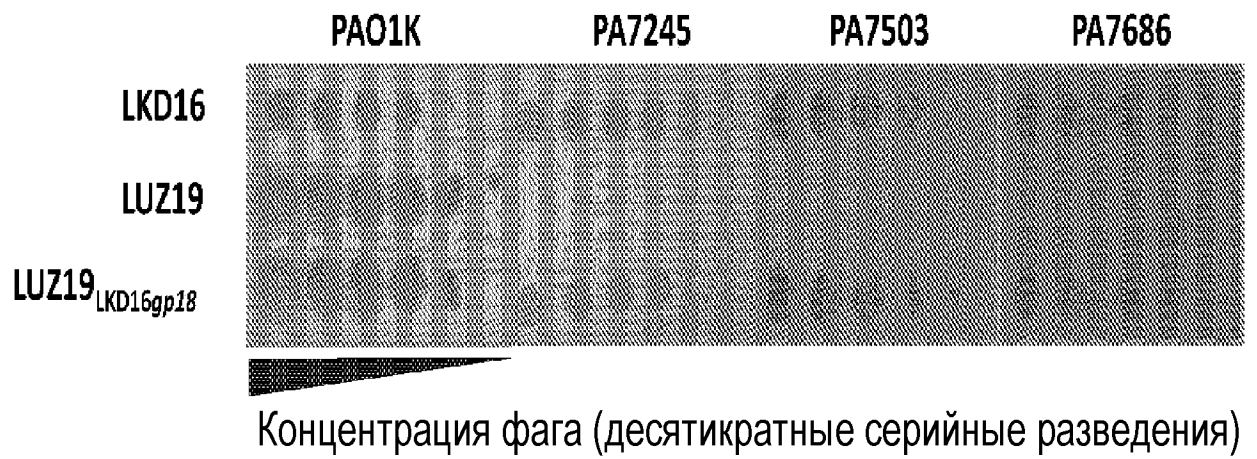
Фаг	Адсорбция	Латентный период	Выход фага
LUZ19	~17	30 мин	70
LUZ19+ <i>gp34</i> L55Δ (LUZ19*)	~12	30 мин	122

ФИГ.5Г-5Д

A)

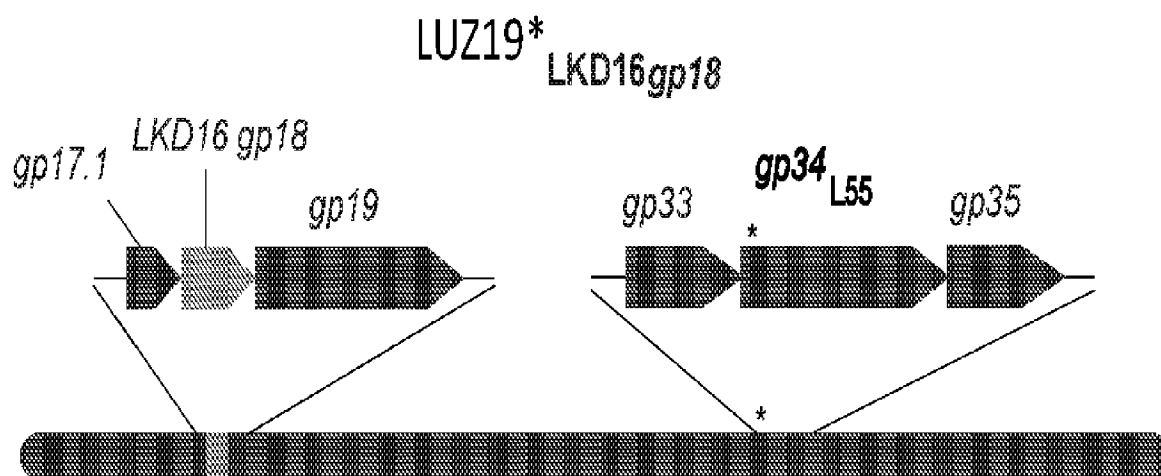


Б)

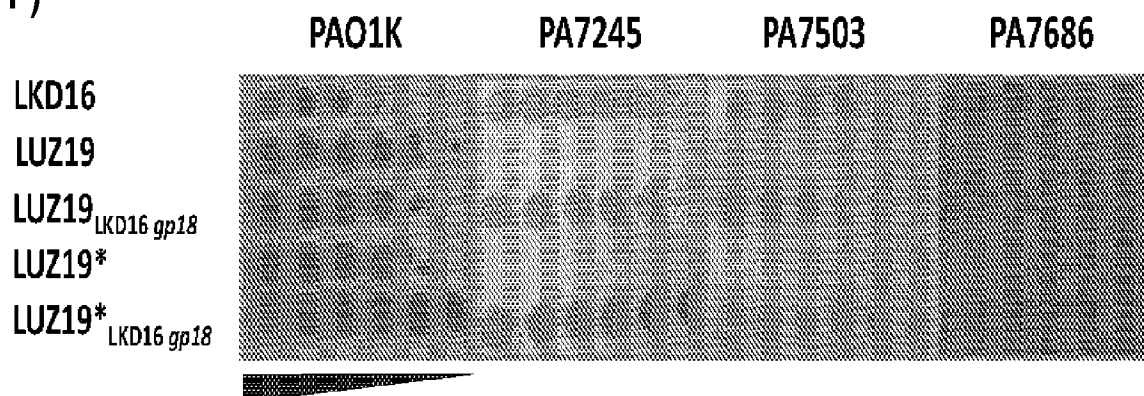


ФИГ.6А-6Б

B)

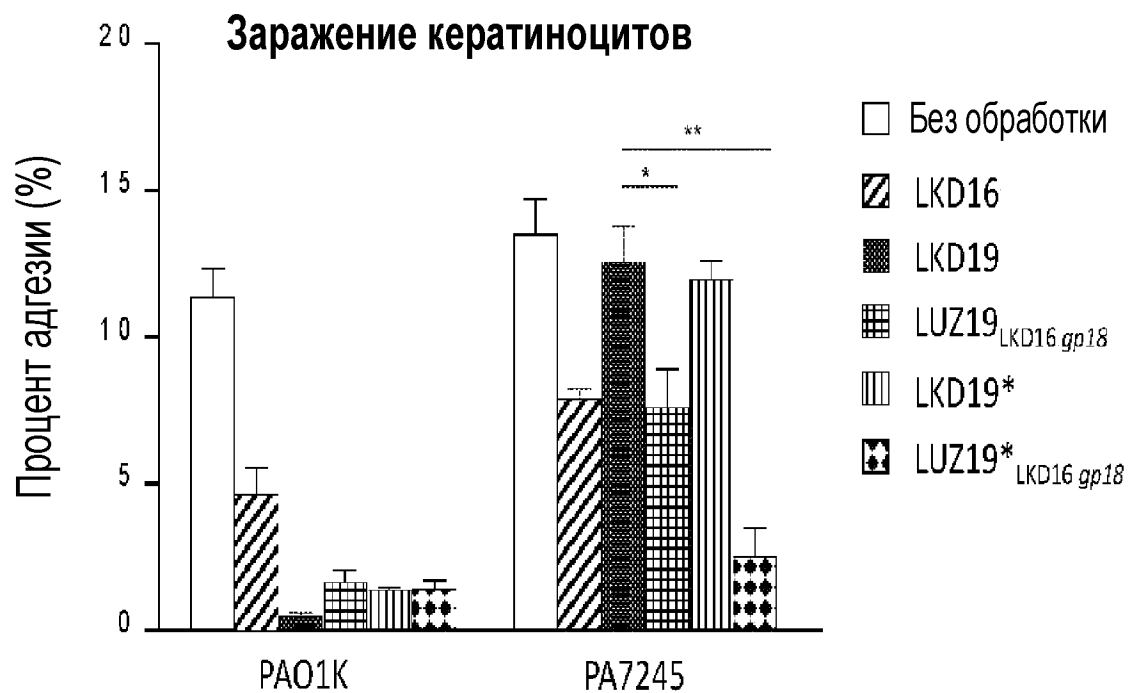


Г)

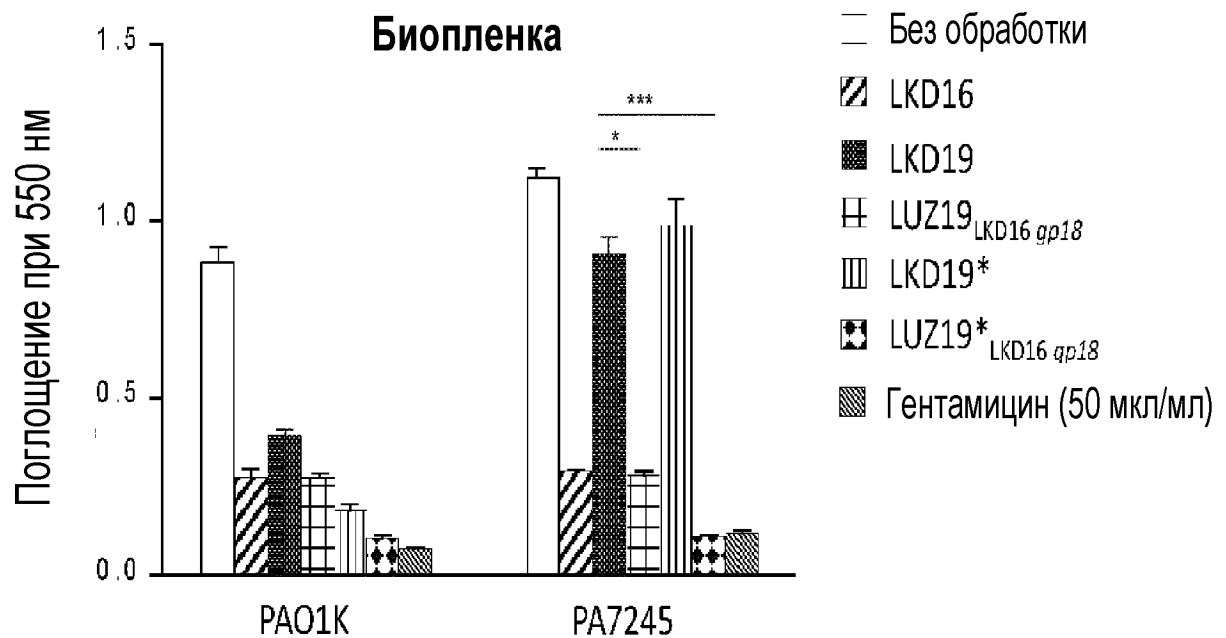


ФИГ.6В-6Г

Д)

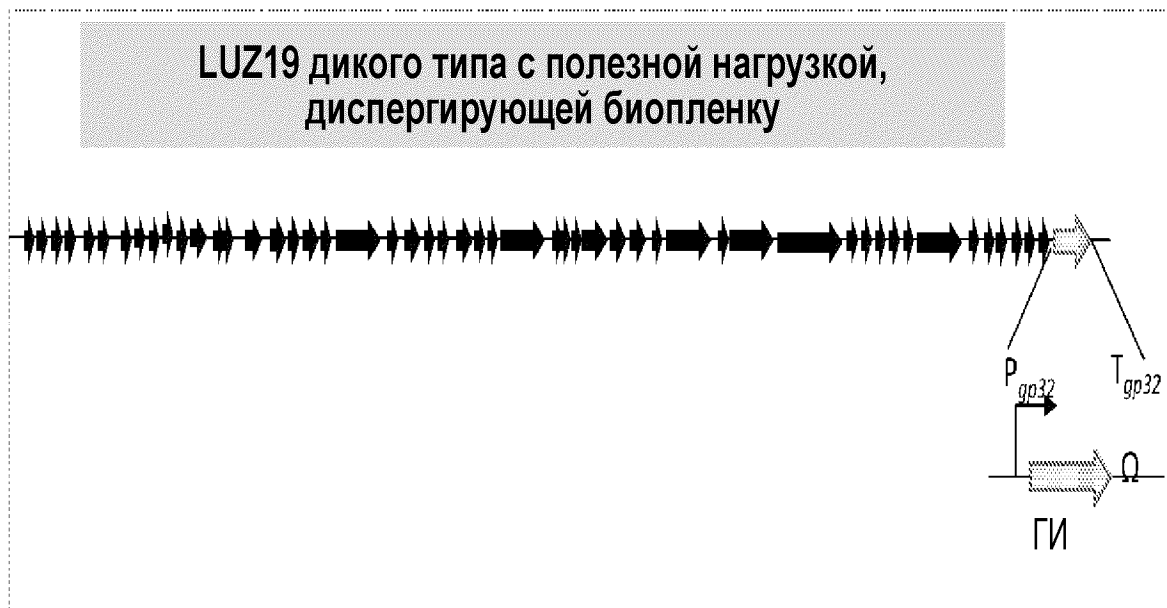


Е)

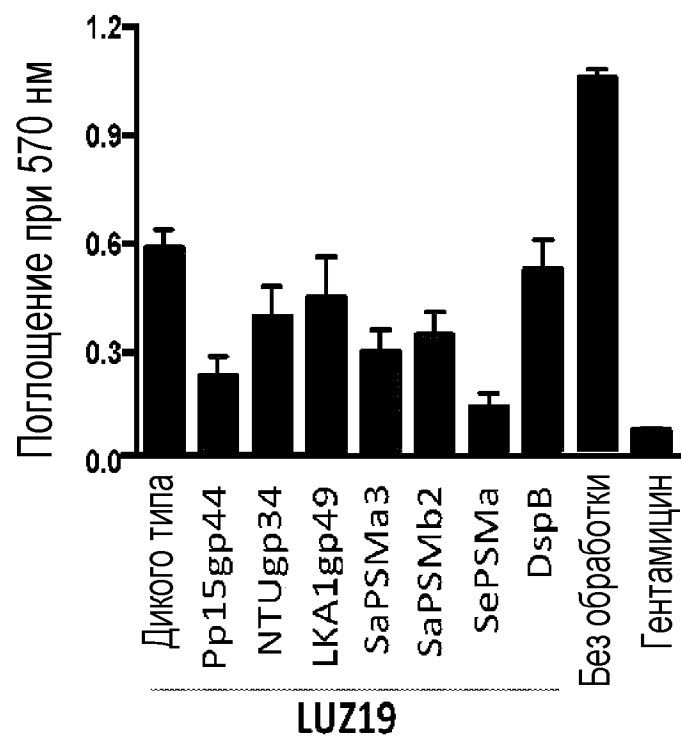


ФИГ.6Д-6Е

A)



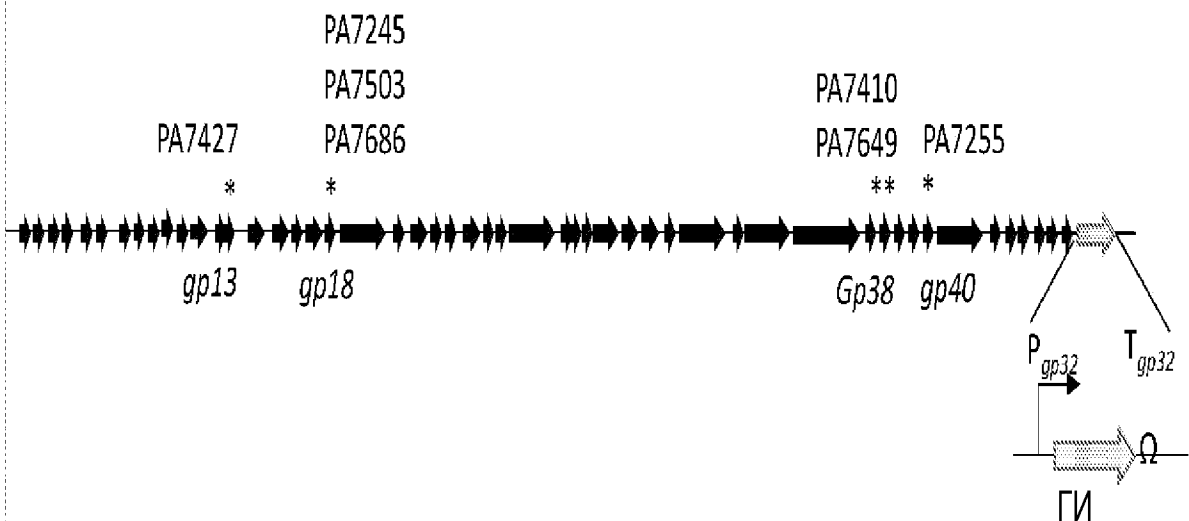
Б)



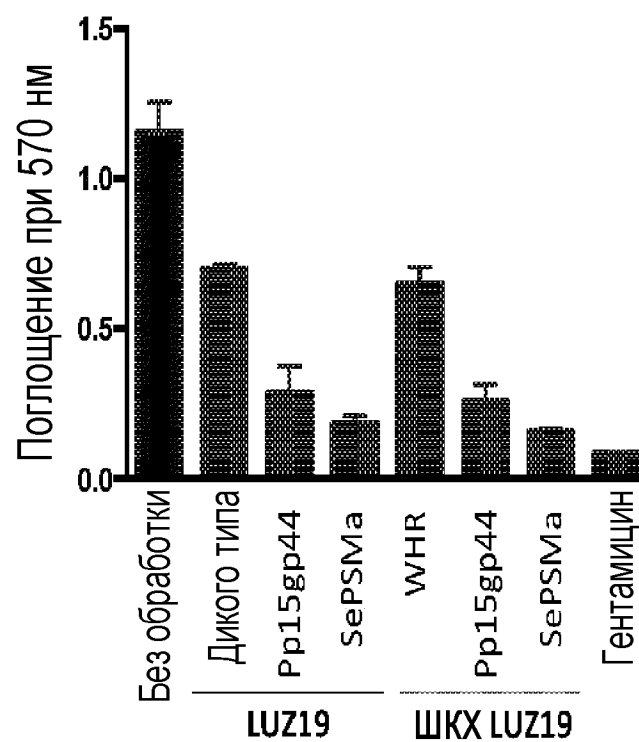
ФИГ.7А-7Б

В)

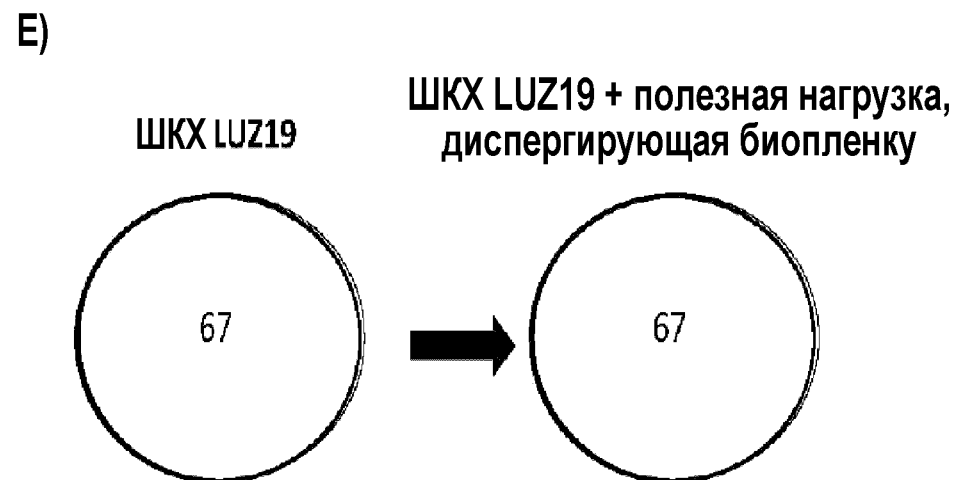
**ШКХ LUZ19 дикого типа с полезной нагрузкой,
диспергирующей биопленку**



Г)



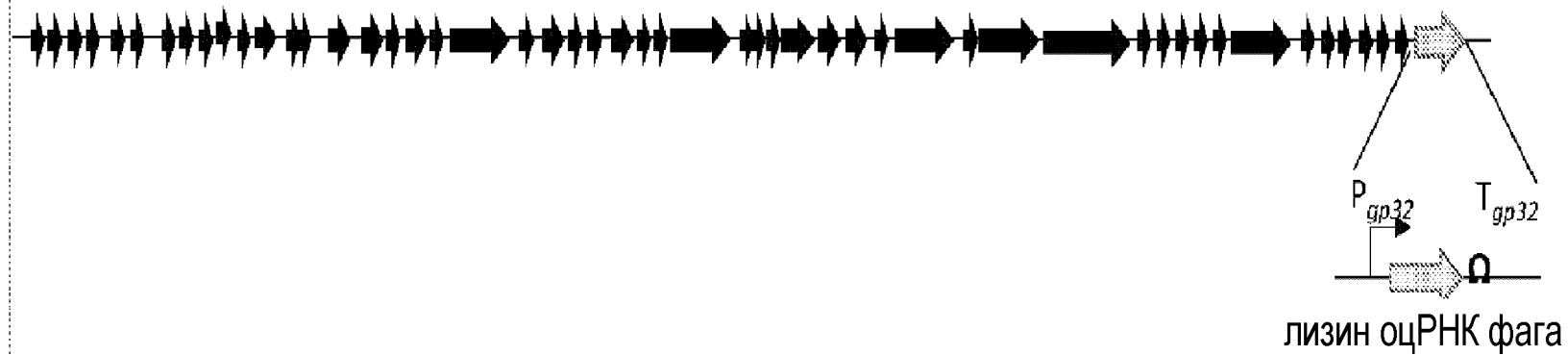
ФИГ.7В-7Г



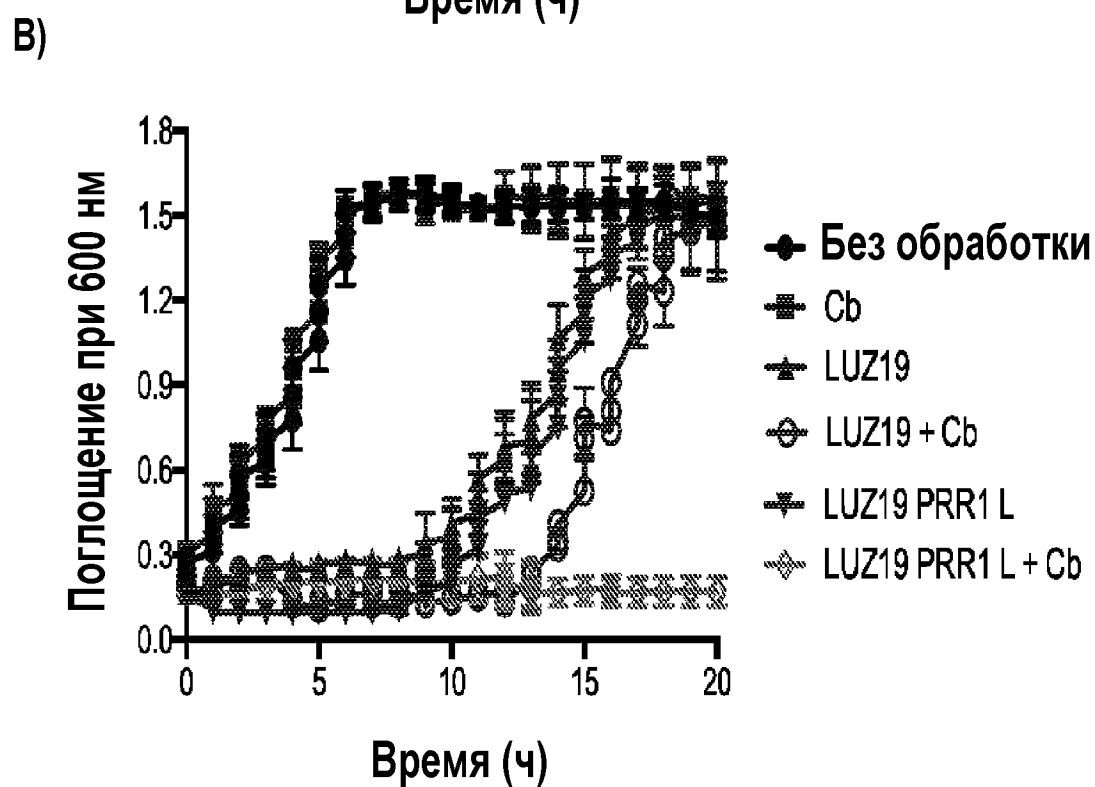
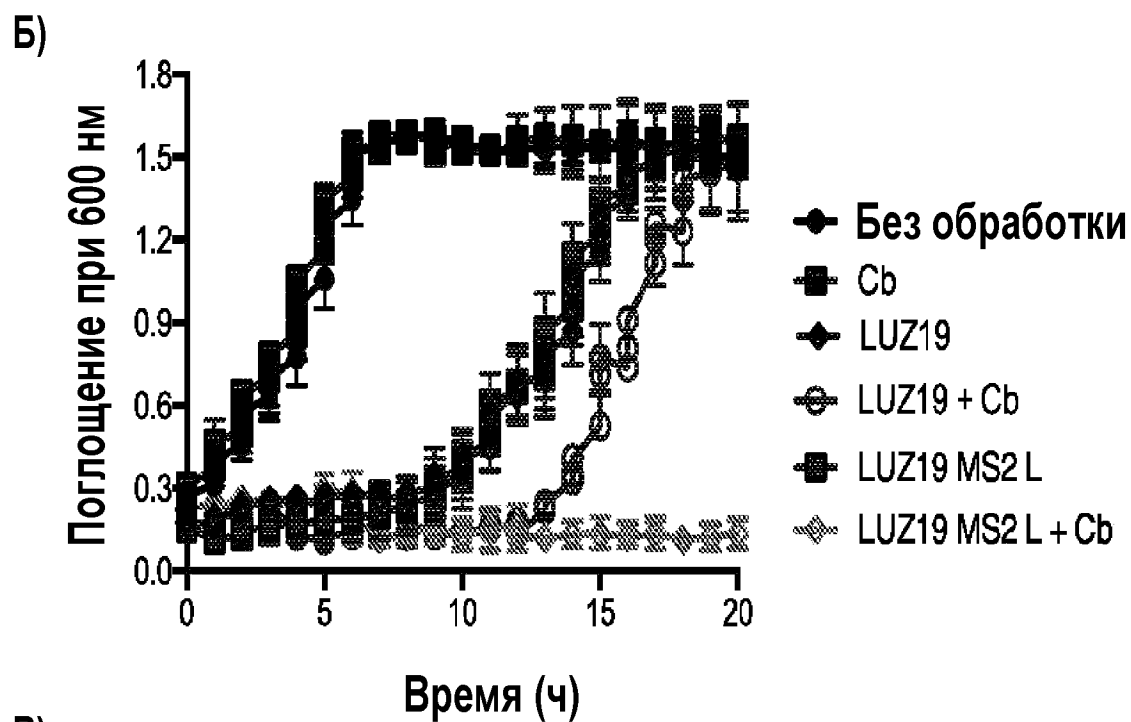
ФИГ.7Д-7Е

A)

LUZ19 дикого типа с полезной нагрузкой лизином оцРНК фага

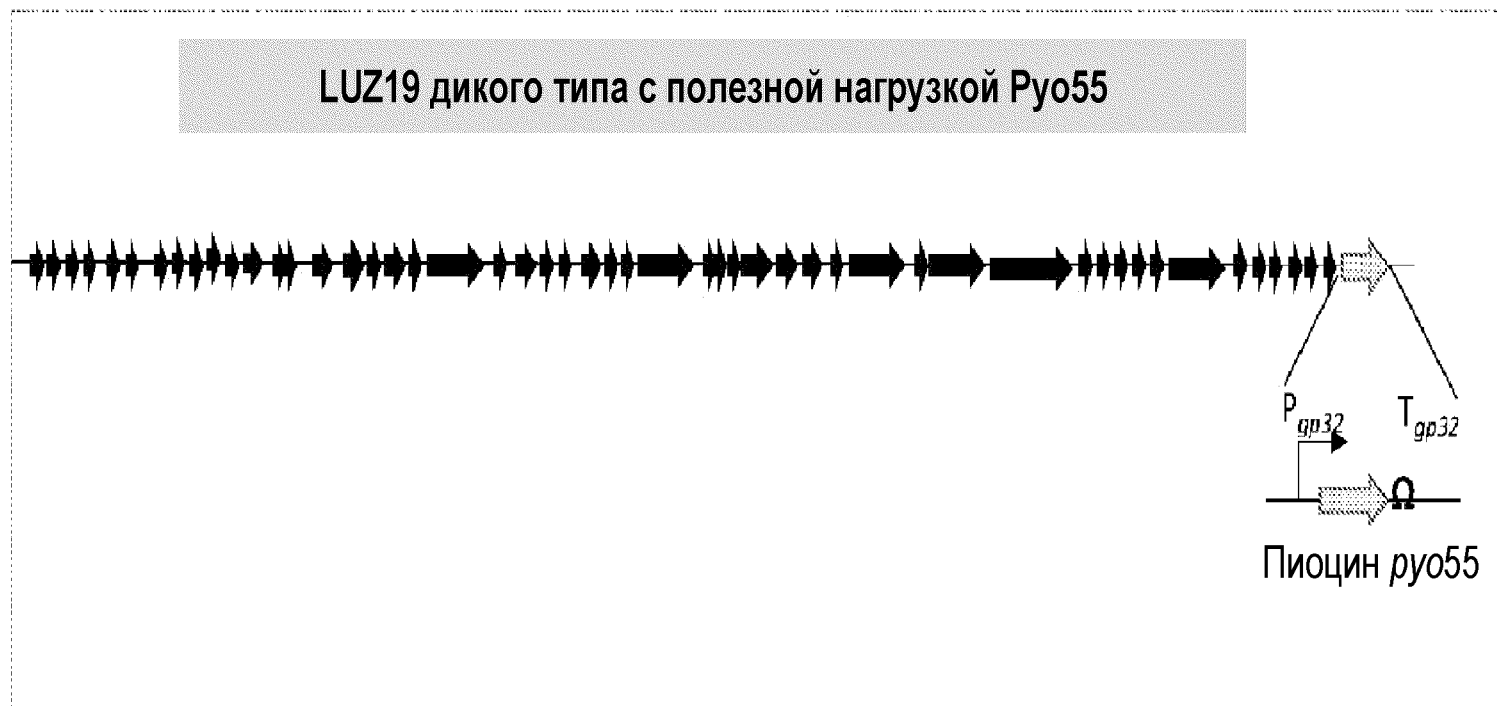


ФИГ.8А



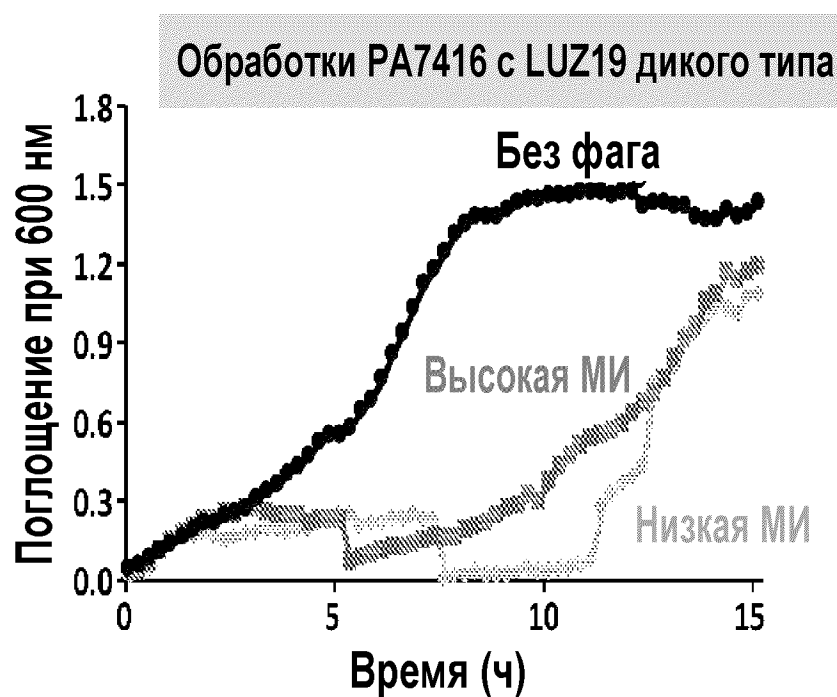
ФИГ.8Б-8В

A)

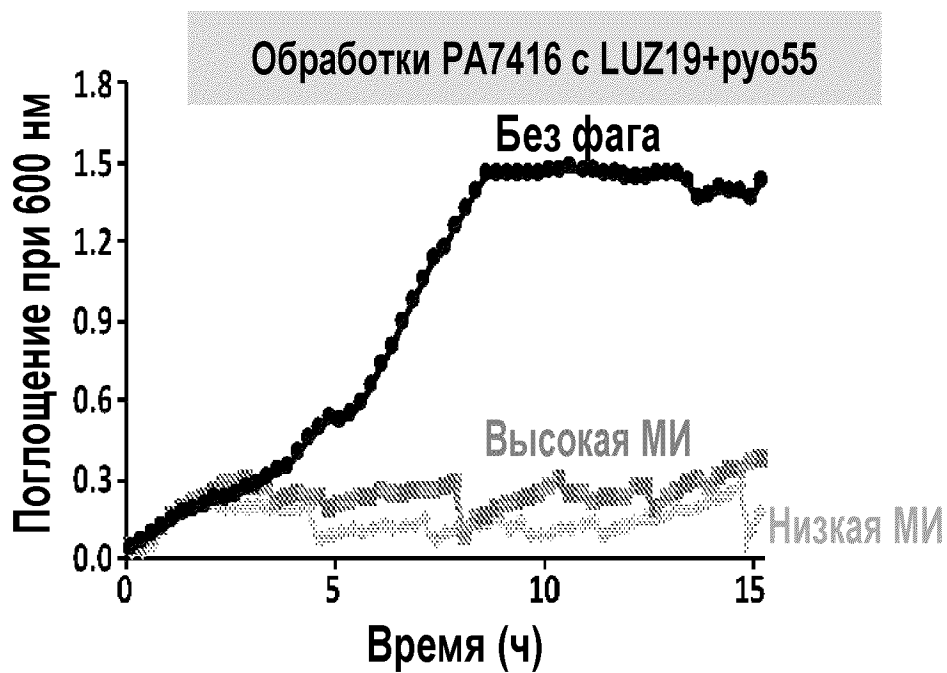


ФИГ.9А

Б)

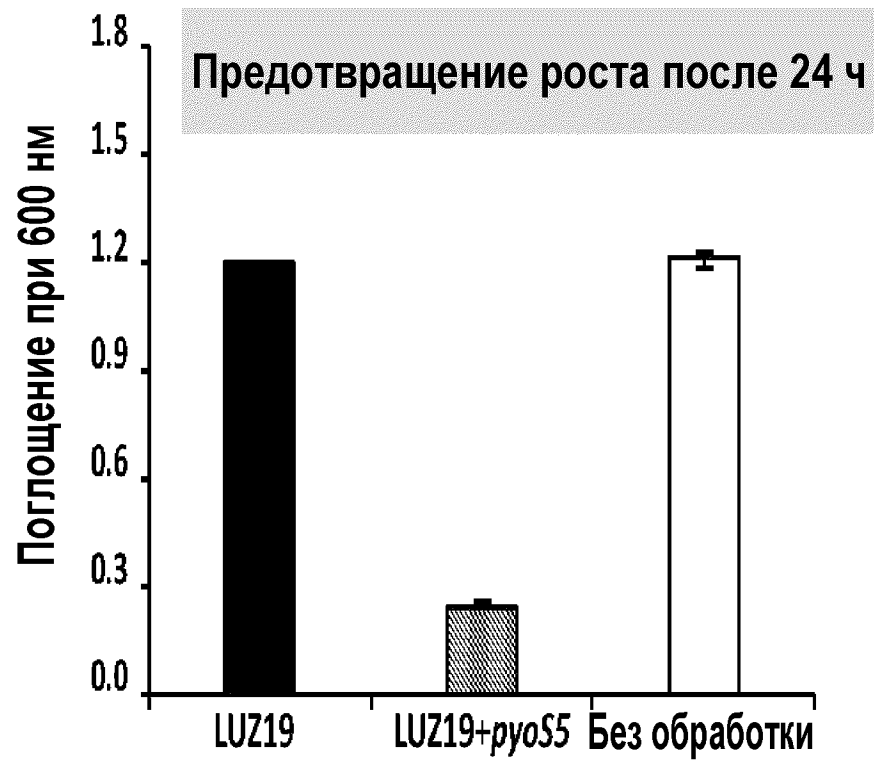


В)

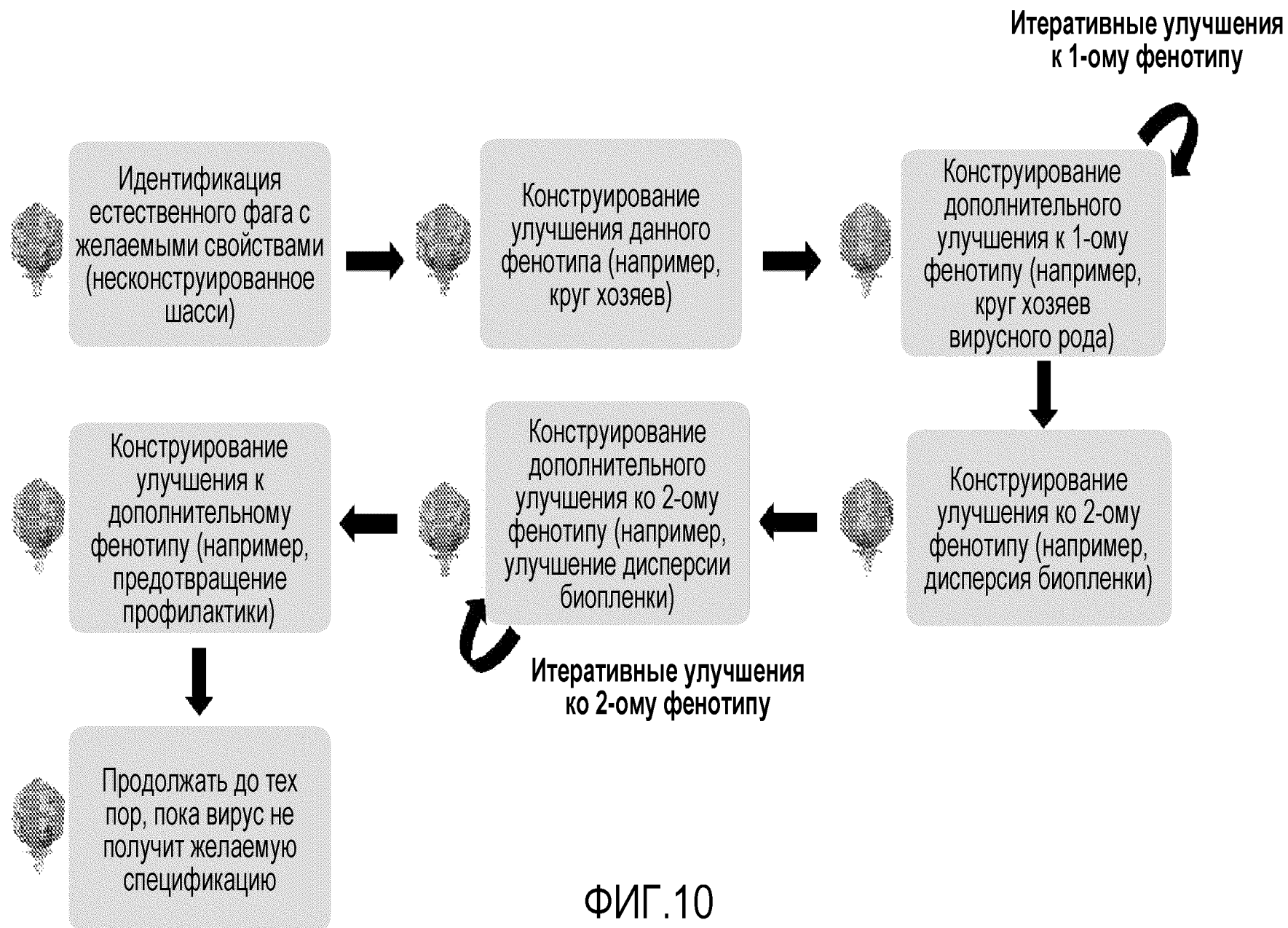


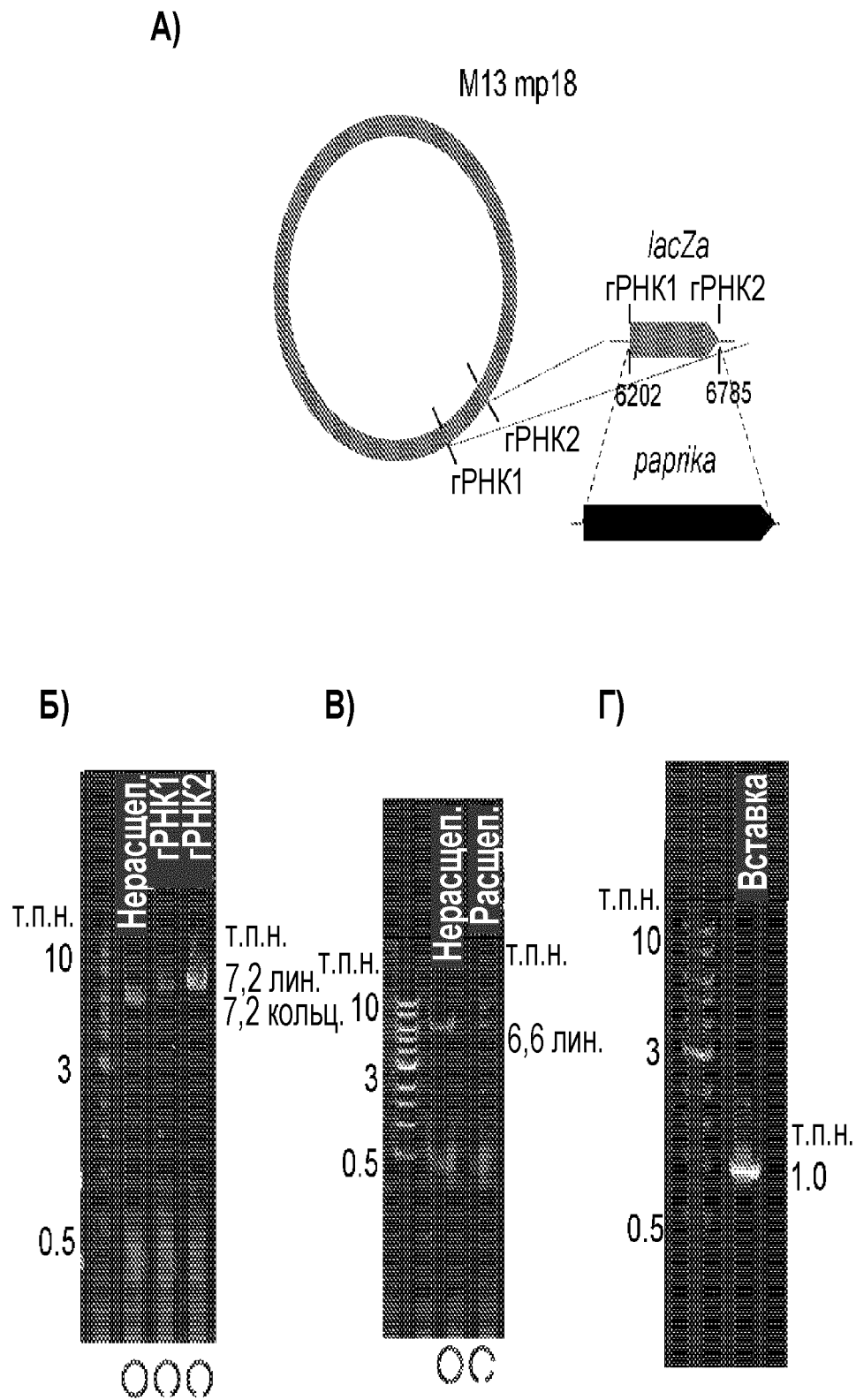
ФИГ.9Б-9В

Г)



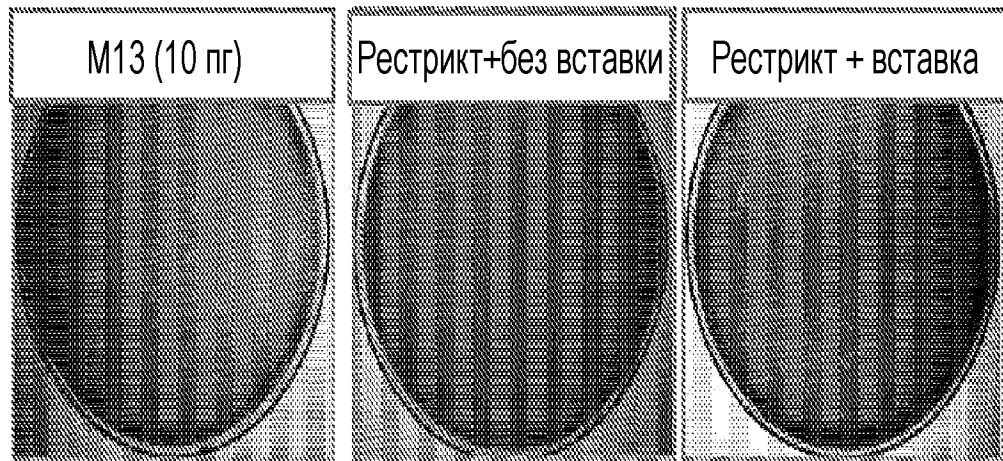
ФИГ.9Г



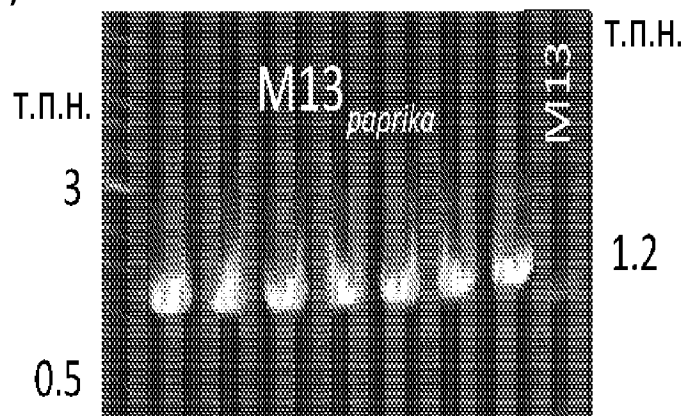


ФИГ.11А-11Г

Д)

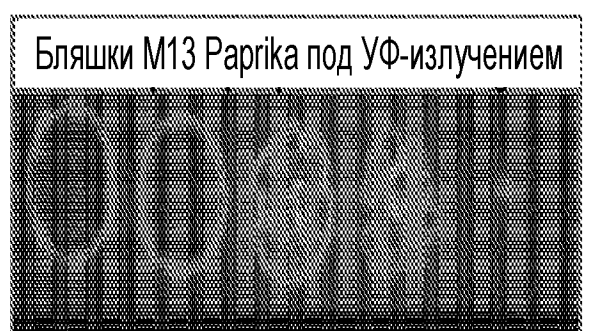
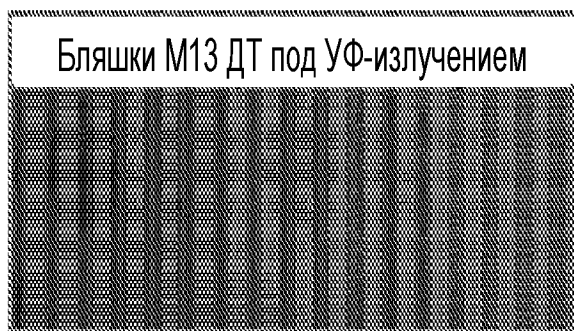


Е)



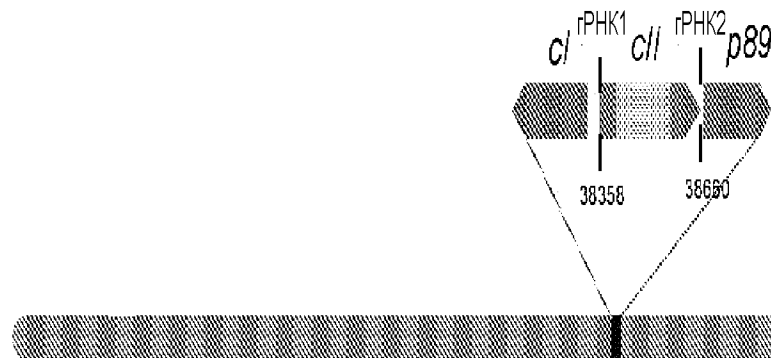
ФИГ.11Д-11Е

Ж)

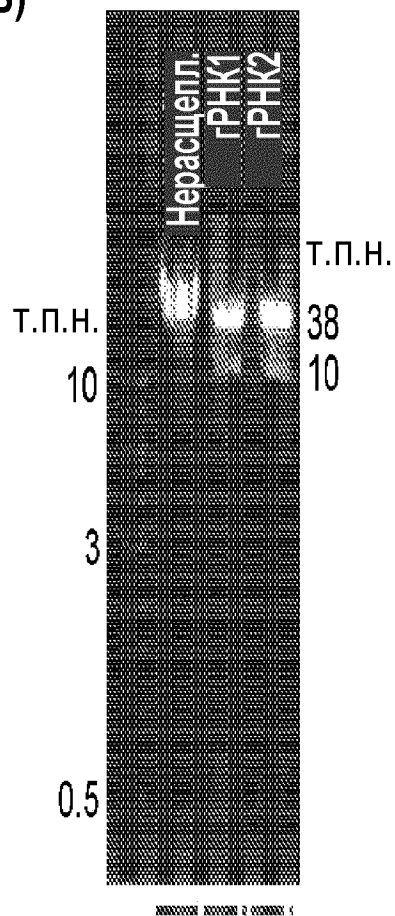


A)

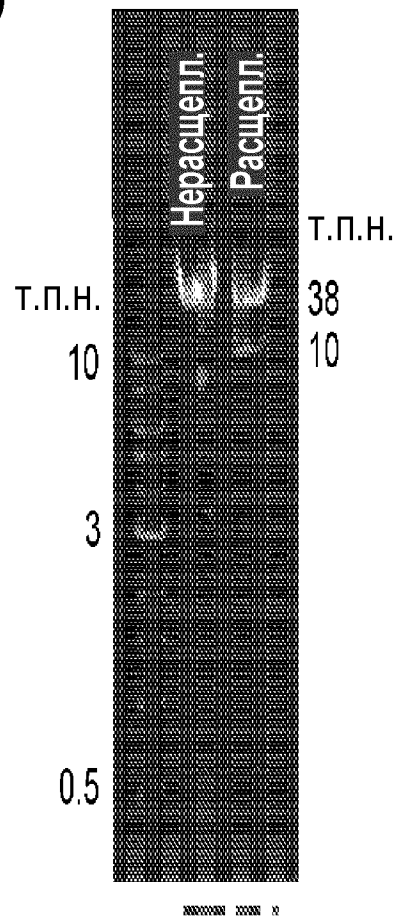
$\lambda \Delta cII$



Б)

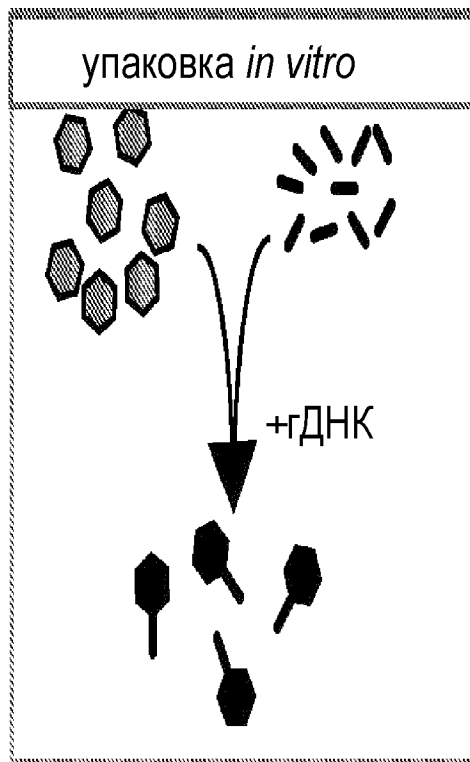


В)

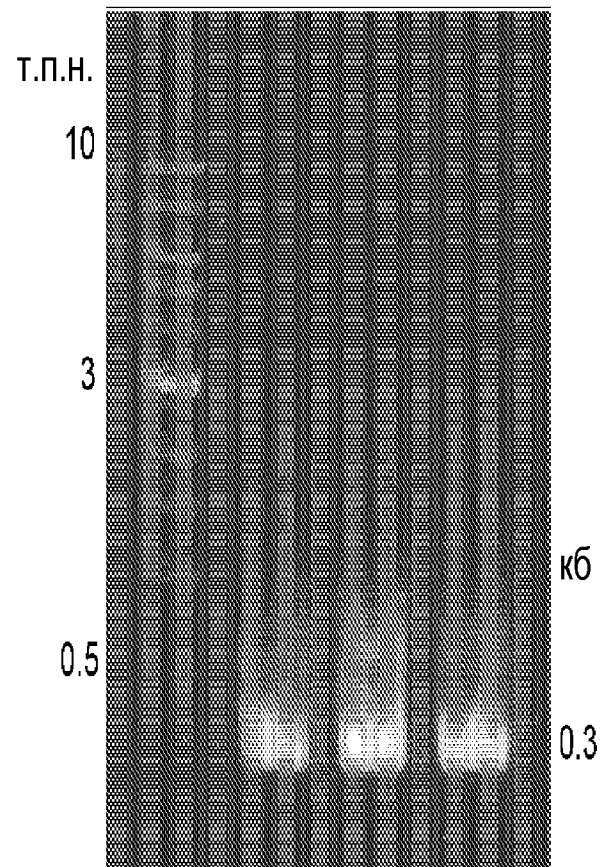


ФИГ.12А-12В

Г)



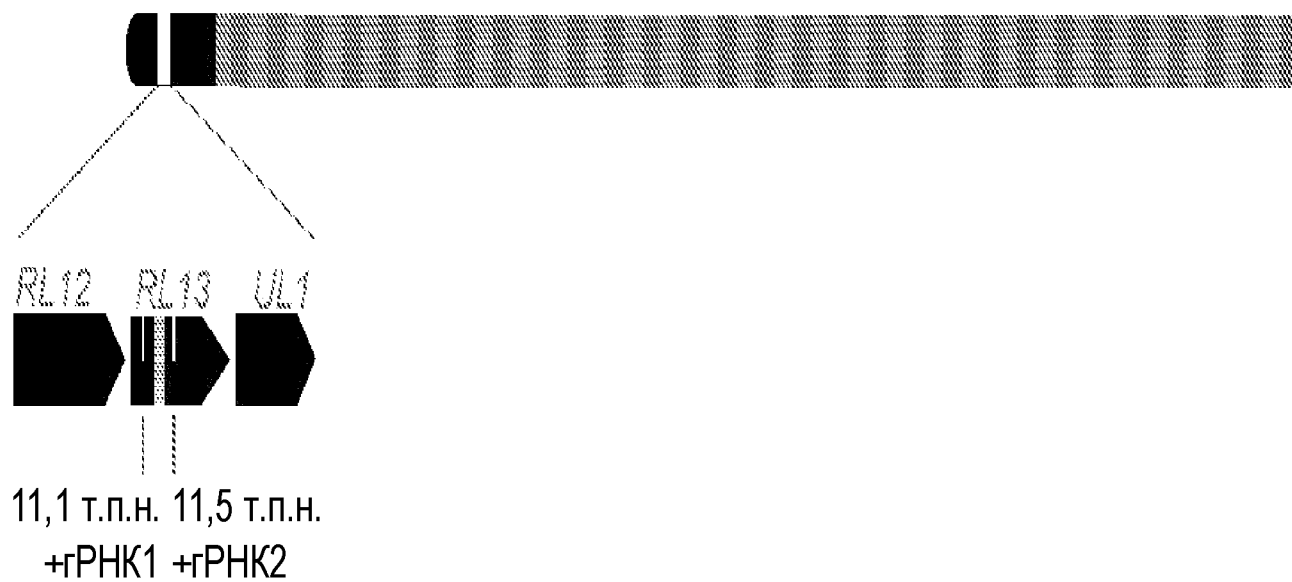
Д)



ФИГ.12Г-12Д

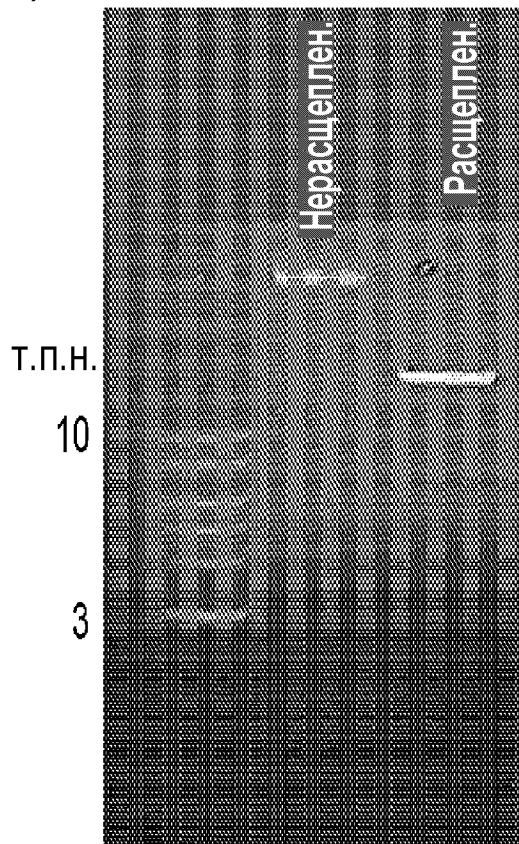
A)

ЦМВ человека (235,4 т.п.н. геном)

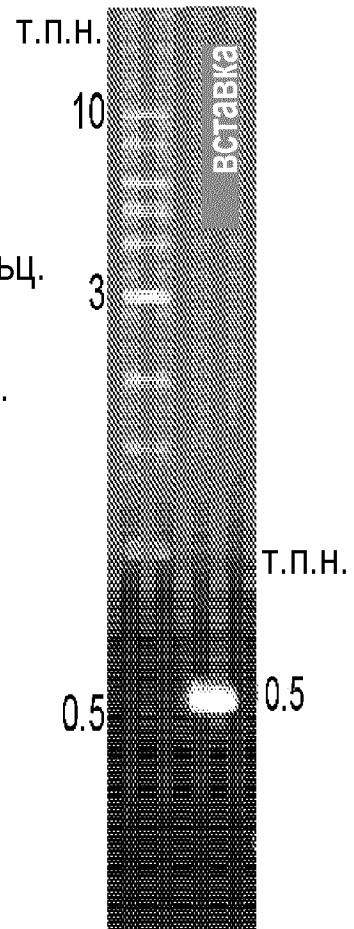


ФИГ.13А

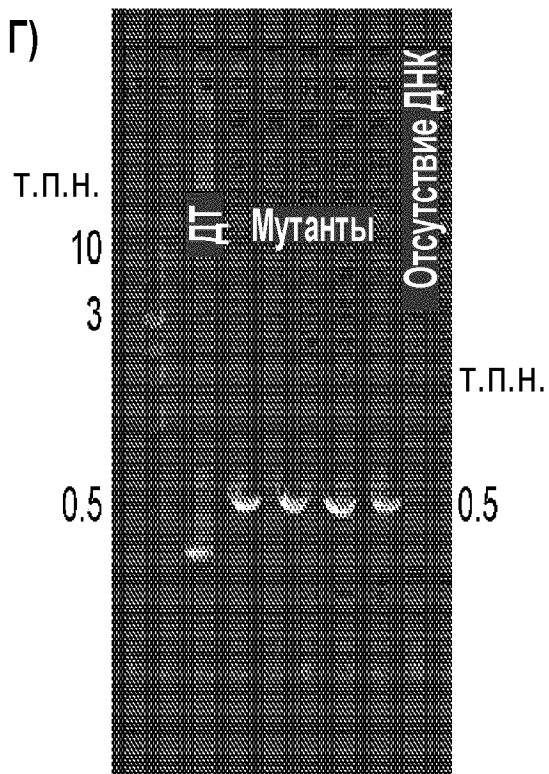
Б)



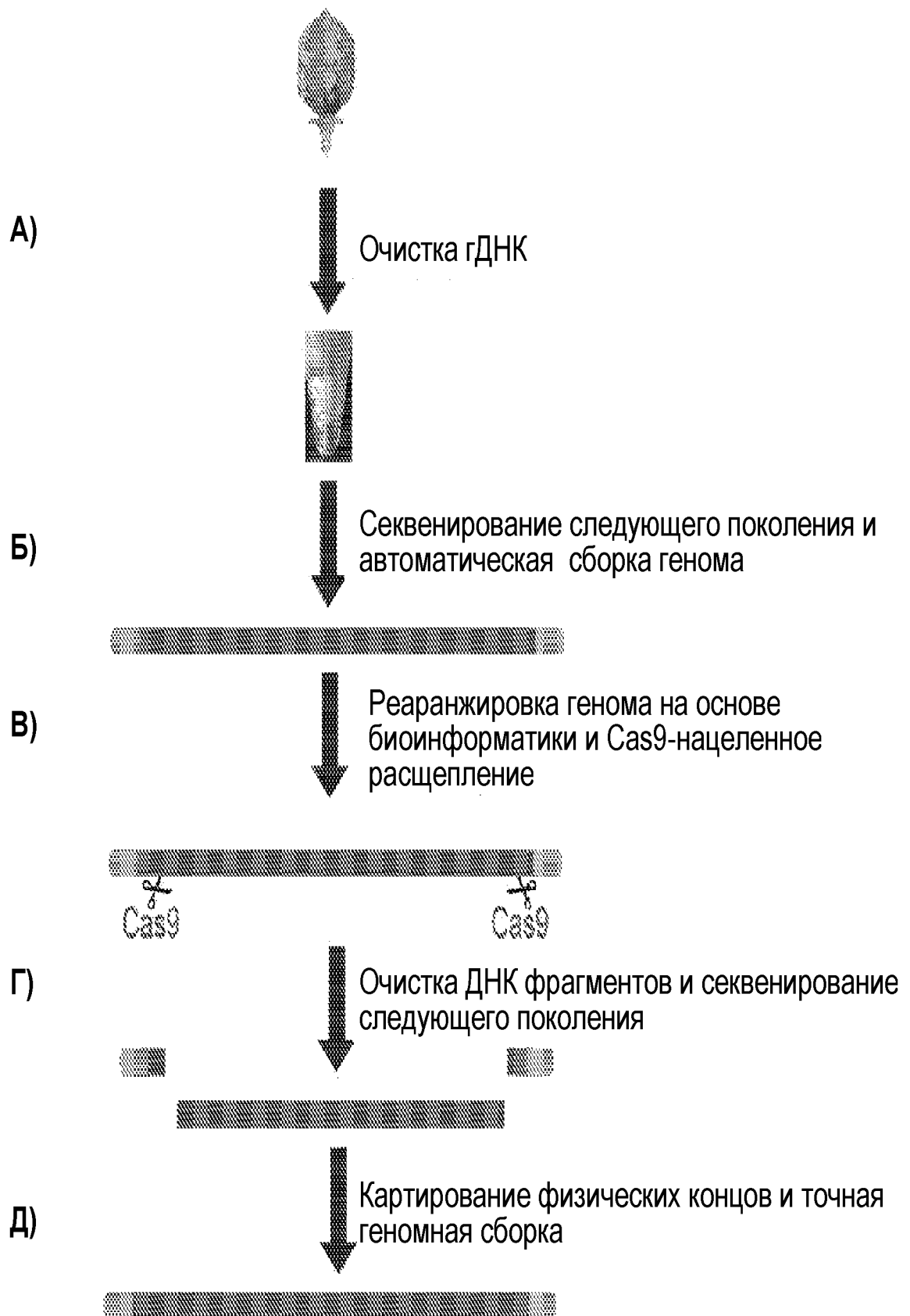
В)



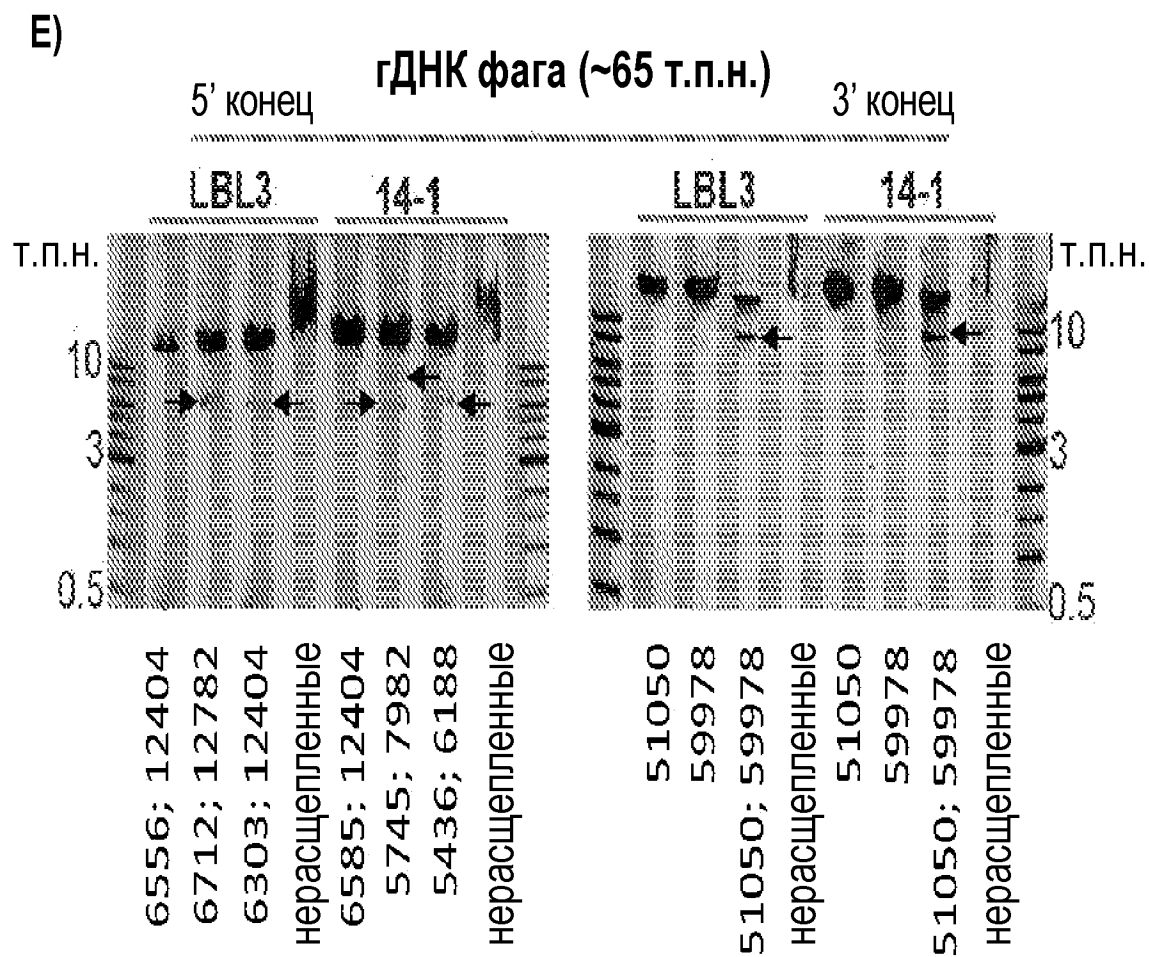
Г)



ФИГ.13Б-13Г



ФИГ.14А-14Д

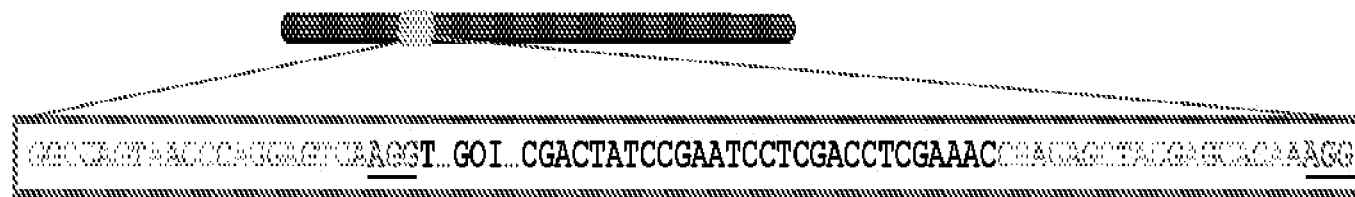


Предсказанные позиции Cas9-расщепления (п.о.)

ФИГ.14Е

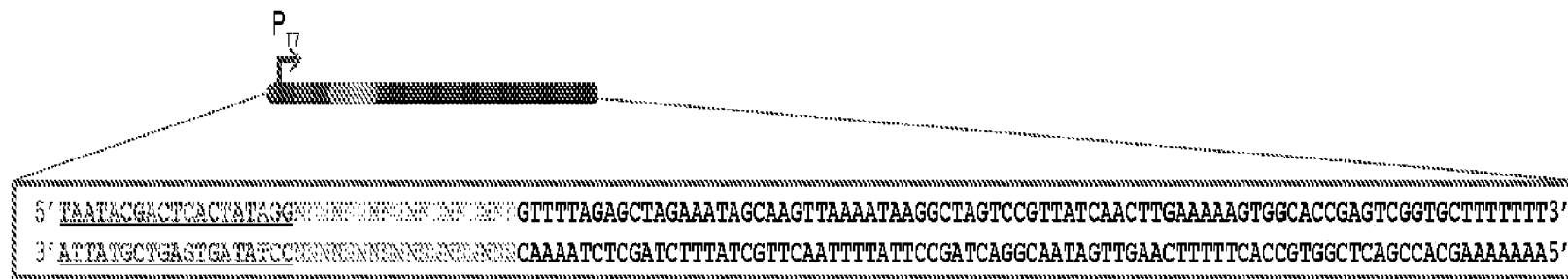
A)

Вирусный геном



ФИГ.15А

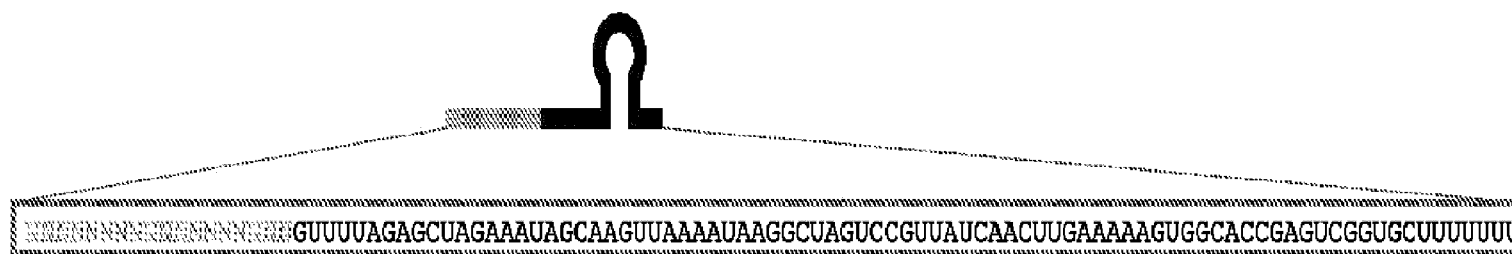
Б) Ультрамерный отжиг и расщепление *in vitro*



ФИГ.15Б

В)

Очищенная огРНК



ФИГ.15В