

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
19 марта 2020 (19.03.2020)



(10) Номер международной публикации
WO 2020/055293 A1

- (51) Международная патентная классификация :
C12N 9/22 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) C12N 15/79 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки : PCT/RU20 19/050 154
- (22) Дата международной подачи :
13 сентября 2019 (13.09.2019)
- (25) Язык подачи : Русский
- (26) Язык публикации : Русский
- (30) Данные о приоритете :
2018132816 14 сентября 2018 (14.09.2018) RU
- (71) Заявитель : ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕ -
СТВО "БИОКАД " (JOINT STOCK COMPANY
"BIOCAD") [RU/RU]; Литер А, д. 34, ул. Связи,
и .Стрельна, Петро дворцовый район, Санкт -Петербург,
1985 15, St.Petersburg (RU).
- (72) Изобретатели : МАДЕРА, Дмитрий Александрович
(MADERA, Dmitriy Aleksandrovich); ул. Космонав -
та Волкова, д. 5, кв. 205, Москва, 127299, Moscow
(RU). КАРАБЕЛЬСКИЙ, Александр Владимирович
(KARABELSKII, Aleksandr Vladimirovich); ул. Ро -
щинская, д.13, кв. 34, г. Гатчина, Ленинградская обл.,
188300, g.Gatchina (RU). ИВАНОВ, Роман Алексе -
евич (IVANOV, Roman Alekseevich); ул. Планетная,
29, корп. 2, кв. 176, Москва, 125167, Moscow (RU).
МОРОЗОВ, Дмитрий Валентинович (MOROZOV,
Dmitry Valentinovich); Адмиралтейский р-он, ул. Поч -
тамтская, д. 20, кв. 3, Санкт -Петербург, 190000,
St.Petersburg (RU). СЕВЕРИНОВ, Константин Вик -
торович (SEVERINOV, Konstantin Viktorovich); ул.
Дмитрия Ульянова, д. 4, корп. 2, кв. 362, Москва,
119333, Moscow (RU). ШМАКОВ, Сергей Анатолие -
вич (SHMAKOV, Sergey Anatolevich); ул. Пионерская,
д. 14, кв. 15, г. Воскресенск, Московская обл., 140200, G.
Voskresensk (RU). СУТОРМИН, Дмитрий Алексан -
дрович (SUTORMIN, Dmitrii Aleksandrovich); тип .

Хомутовский, д.4, корп. 1, кв. 46, Москва, 105064,
Moscow (RU). ПОБЕГАЛОВ, Георгий Евгеньевич
(POBEGALOV, Georgii Evgenievich); ул. Партиза -
на Германа, д.12, кв. 317, Санкт -Петербург, 198205,
St.Petersburg (RU). ВАСИЛЬЕВА, Александра Ан -
дreeвна (VASILEVA, Aleksandra Andreevna); ул.
Партизана Германа, д. 41, кв. 144, Санкт -Петербург,
198334, St.Petersburg (RU). СЕЛЬКОВА, Полина Ана -
тольевна (SELKOVA, Polina Anatolevna); ул. Верх -
няя, д.15, кв. 72, г. Воткинск, Рес. Удмуртская, 427439,
G. Votkinsk, (RU). АРСЕНИЕВ, Анатолий Никола -
евич (ARSENIEV, Anatolii Nikolaevich); пр-кт Но -
вочеркасский, д.25, корп. 1, кв. 36, Санкт -Петербург,
1951 12, St.Petersburg (RU). ЗЮБКО, Татьяна Игорев -
на (ZYUBKO, Tatyana Igorevna); д.9А, пос. Малое Бо -
рисово, Г. Калининград, 236034, G. Kaliningrad (RU).
ФЕДОРОВА, Яна Витальевна (FEDOROVA, Iana
Vitalevna); ул. Куприна, д.40, кв. 14, г. Гатчина, Ленин -
градская обл., 188301, G. Gatchina, (RU).

(74) Агент : ПОЛУДНИЦЫНА, Галина Владимиров -
на (POLUDNICZYNA, Galina Vladimirovna); ЗАО
"БИОКАД", Литер А, д. 34, ул. Связи, п. Стрель -
на, Петродворцовый район, Санкт -Петербург, 1985 15,
St.Petersburg (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны) : АЕ, АG, АL, АМ,
АО, АТ, АU, АZ, ВА, ВВ, ВG, ВН, ВN, ВR, ВW, ВY, ВZ,
СА, СH, СL, СN, СО, СR, СU, СZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, ЕС, ЕЕ, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, Ш, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW, GH,

(54) Title: PACAS9 NUCLEASE

(54) Название изобретения : НУКЛЕАЗА PACAS9

(57) Abstract: The present invention relates to biotechnology, molecular biology and medicine, and more precisely to a nuclease enzyme and use thereof. More particularly, the present invention relates to a PaCas9 nuclease enzyme. The invention also relates to a nucleic acid encoding said nuclease, a genetic construct, an expression vector, a vector for delivery, which include said nucleic acid, a liposome incorporating said nuclease or nucleic acid encoding said nuclease, a method for producing nuclease, methods of delivery, as well as a host cell which includes a nucleic acid encoding said nuclease.

(57) Реферат : Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, молекулярной биологии и медицины, а именно к ферменту нуклеазе и применению данного фермента нуклеазы. Более конкретно, настоящее изобретение относится к ферменту нуклеазе PaCas9. Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей данную нуклеазу, генетической конструкции, экспрессионному вектору, вектору для доставки, которые включают данную нуклеиновую кислоту, липосоме, включающей данную нуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую данную нуклеазу, способу получения нуклеазы, способам доставки, а также к клетке-хозяину, которая включает нуклеиновую кислоту, кодирующую данную нуклеазу.

WO 2020/055293 A1

GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,

UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,

TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY,

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,

LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,

SI, SK, SM, TR), ОAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,

GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

- касающаяся установления личности изобретателя (правило 4.17 (i))
- касающаяся права заявителя подавать заявку на патент и получать его (правило 4.17 (П))
- касающаяся права испрашивать прторитет предшествующей заявки (правило 4.17 (Ш))
- об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована :

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилем 5.2(a)

НУКЛЕАЗА PaCas 9

Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, молекулярной биологии и медицины, а именно к ферменту нуклеазе и применению данного фермента нуклеазы. Более конкретно, настоящее изобретение относится к ферменту нуклеазе PaCas9. Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей данную нуклеазу, генетической конструкции, экспрессионному вектору, вектору для доставки, которые включают данную нуклеиновую кислоту, липосоме, включающей данную нуклеазу или нуклеиновую кислоту, кодирующую данную нуклеазу, способу получения нуклеазы, способам доставки, а также к клетке-хозяину, которая включает нуклеиновую кислоту, кодирующую данную нуклеазу.

Уровень техники

В 2007 году впервые было продемонстрировано, что CRISPR-Cas представляет собой адаптивную иммунную систему у многих бактерий и большинства археев (Barrangou et al., 2007, Science 315: 1709-1712, Brouns et al., 2008, Science 321: 960-964). До сих пор были охарактеризованы три типа систем CRISPR-Cas на основе функциональных и структурных критериев, большинство из которых использует малые молекулы РНК в качестве гид-РНК для направления на комплементарные последовательности ДНК-мишеней (Makarova et al., 2011, Nat Rev Microbiol 9: 467-477, Van der Oost et al., 2014, Nat Rev Microbiol 12: 479-492).

В недавнем исследовании лабораторий Doudna/Charpentier была проведена тщательная характеристика эффекторного фермента системы типа II CRISPR-Cas (Cas9), включая демонстрацию того, что введение созданных с помощью CRISPR гид-РНК (со специфическими спейсерными последовательностями) направлено действует на комплементарные последовательности (протоспейсеры) на плазмиде, вызывая разрывы двойной цепи этой плазмиды (Jinek et al., 2012, Science 337: 816-821). Затем Jinek et al., 2012 использовали Cas9 как инструмент для редактирования генома.

Cas9 использовали для редактирования геномов ряда эукариотических клеток (например, рыб, растений, человека) (Charpentier and Doudna, 2013, Nature 495: 50-51).

Кроме того, Cas9 использовали для улучшения выходов гомологичной рекомбинации у бактерий путем отбора целенаправленных событий рекомбинации (Jiang et al., 2013, Nature Biotechnol 31: 233-239). Для достижения этого токсический фрагмент (направляющий конструкт) подвергают совместной трансфекции со спасающим фрагментом, несущим требуемое изменение (редактирующий конструкт, несущий точечную мутацию или делеции). Направляющий конструкт состоит из Cas 9 в сочетании со сконструированным CRISPR и маркером устойчивости к антибиотикам, определяя сайт желаемой рекомбинации на

хромосоме хозяина ; в присутствии соответствующего антибиотика отбирают интеграцию направляющего конструкта в хромосому хозяина . Только тогда , когда происходит дополнительная рекомбинация редактирующего конструкта с целевым сайтом CRISPR в другом месте на хромосоме хозяина , хозяин может избежать проблемы аутоиммунитета . Следовательно , в присутствии антибиотика только желаемые (свободные от маркера) мутанты способны выживать и расти . Также представлена сходная стратегия выбора для последующего удаления интегрированного направляющего конструкта из хромосомы , создающая свободный от собственного маркера мутант .

В последние годы было установлено , что редактирование генома , опосредуемое CRISPR-Cas , является полезным инструментом для генной инженерии . Установлено , что прокариотические системы CRISPR служат своим хозяевам как адаптивные иммунные системы (Jinek et al. , 2012 , Science 337: 816-821) и могут быть использованы для быстрой и эффективной генной инженерии (например , Mali et al. , 2013 , Nat Methods 10: 957-963) , требуя только модификации гид-последовательности для направления на интересующие последовательности .

Тем не менее , существует постоянная потребность в разработке агентов с улучшенным определением специфической для последовательности нуклеиновой кислоты , ее расщеплением и манипуляциями в различных экспериментальных условиях для применения в области генетических исследований и редактирования генома .

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к нуклеазе PaCas9 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 .

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты , которая кодирует нуклеазу PaCas9 , с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 .

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору , содержащему нуклеиновую кислоту с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 .

В некоторых вариантах экспрессионный вектор представляет собой генетическую конструкцию , указанную на фиг . 1 , PpCas9-T2A-GFP-sgRNA1-MCS-sgRNA2-MCS .

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору для доставки терапевтического агента , содержащего нуклеиновую кислоту с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 .

В одном из вариантов настоящего изобретения вектор доставляет терапевтический агент в клетки-мишени или ткани-мишени .

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к липосоме для доставки терапевтического агента , включающего нуклеазу PaCas9 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или нуклеиновую кислоту с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 .

В одном из вариантов настоящего изобретения липосома доставляет терапевтический агент в клетки –мишени или ткани –мишени .

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу доставки в клетки –мишени или ткани –мишени терапевтического агента с помощью вышеуказанного вектора или вышеуказанной липосомы .

В одном из вариантов способа доставки в клетки –мишени или ткани –мишени терапевтического агента осуществляется путем введения в организм млекопитающего вышеуказанного вектора или вышеуказанной липосомы .

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки –хозяина для получения нуклеазы PaCas9 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, который включает трансформирование клетки любым вышеуказанным вектором .

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения нуклеазы PaCas9, заключающемуся в культивировании вышеуказанной клетки –хозяина в культуральной среде в условиях, необходимых для получения указанной нуклеазы PaCas9, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученной нуклеазы PaCas9.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Кольцевая схема плазмиды PpCas9-T2A-GFP-sgRNA1-MCS-sgRNA2-MCS, предназначенной для наработки нуклеазы PpCas9 в клетках млекопитающих .

AmpR – ген бета –лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину ,

CMV promoter – промотор ранних генов цитомегаловируса ,
Kozak sequence – последовательность Kozak для повышения эффективности трансляции белка ,

START codon – старт –кодон ,

NLS – сигналы ядерной локализации (NLS),

PaCas9 – нуклеотидная последовательностью SEQ ID NO: 1, кодирующая нуклеазу PaCas9 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 ,

FLAG – последовательность эпитопа FLAG для детекции белка ,

GFP – модифицированный зелёный флуоресцентный белок ,

TK pA – последовательность поли –А сигнала тимидинкиназы для повышения стабильности мРНК

FI ori – ориджин репликации, который позволяет плазмиде упаковываться в фаговые частицы при котрансформации с фагами – помощниками ,

polIII term + U6 promoter – кассеты для экспрессии малых молекул РНК, каждая кассета содержит U6 промотор и терминатор транскрипции РНК полимеразы III.

pUC origin – pUC ориджин репликации в бактериях .

Фиг. 2. Аминокислотная последовательность нуклеазы PaCas9 с распределением по доменам.

Описание изобретения

Определения и общие методы

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

Под «млекопитающим» понимается любое животное, классифицируемое как млекопитающее, в том числе приматы, люди, грызуны, собачьи, кошачьи, крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, лошади, свиньи и т.д.

Нуклеаза

Нуклеазы – большая группа ферментов, гидролизующих фосфодиэфирную связь между субъединицами нуклеиновых кислот.

Различают несколько типов нуклеаз в зависимости от их специфичности и активности: экзонуклеазы и эндонуклеазы, рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, рестриктазы и некоторые другие. Рестриктазы занимают важное положение в прикладной молекулярной биологии.

Нуклеаза PaCas9 относится к типу дезоксирибонуклеаз.

Нуклеаза PaCas9 способна расщеплять ДНК, включающую последовательность нуклеиновой кислоты –мишени, при связывании, по меньшей мере, с одной молекулой РНК, которая распознает последовательность –мишень.

Нуклеаза PaCas9 содержит два эндонуклеазных домена, которые поодиночке вносят одноцепочечные разрывы, а действуя совместно – двуцепочечный разрыв.

Нуклеаза PaCas9 представляет собой эффекторный фермент системы типа II CRISPR-Cas (нуклеаза второго типа).

Нуклеаза PaCas9 способна создавать двухцепочечный разрыв в ДНК с высокоспецифичным сайтом узнавания (16-20 букв).

ДНК нуклеазы PaCas9 представлена в SEQ ID NO:1.

Аминокислотная последовательность нуклеазы PaCas9 представлена в SEQ ID NO: 2

На фигуре 2 приведена аминокислотная последовательность нуклеазы PaCas9 с распределением по доменам.

Нуклеаза PaCas9 связана с изолированным кластером регулярно расположенных группами коротких палиндромных повторов (CRISPR), а также находящимися по соседству остальными компонентами CRISPR-Cas системы: последовательностями crRNA и tracrRNA.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая tracrRNA, представлена в SEQ ID NO:3.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая прямой повтор DR, представлена в SEQ ID NO: 4.

crRNA состоит из варибельной части, зависящей от мишени, и последовательности прямого повтора DR, представленной в SEQ ID NO: 4.

Под «терапевтическим агентом» в данном изобретении подразумевается нуклеаза PaCas9 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует нуклеазу PaCas9, с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

tracrRNA (транс-активирующая crRNA) - это небольшая транс-кодированная РНК.

CRISPR (от англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) - это особые локусы бактерий и архей, состоящие из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными последовательностями (спейсерами).

Молекулы нуклеиновых кислот

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность» или «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также

здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток –хозяев), или полученные путем химического синтеза.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты –примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты нуклеазы. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, находящуюся в клетках, в которых в норме происходит экспрессия нуклеазы, например, в случае, если молекула нуклеиновой кислоты имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в клетках в естественных условиях.

Термин нуклеотидная последовательность охватывает его комплимент, если не указано иное. Таким образом, нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

Выражение «контролирующие последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в определенном организме – хозяине. Пригодные для прокариот контролирующие последовательности представляют собой, например, промотор, необязательно оператор и сайт связывания рибосомы. Как известно, в эукариотических клетках присутствуют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота «функционально связана», если она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК предпоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связывают с ДНК полипептида, если он экспрессируется в виде предпротеина, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связывают с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; сайт связывания рибосомы функционально связывают с кодирующей последовательностью, если он расположен так, что может облегчать трансляцию. Как правило, «функционально связан» обозначает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторной лидерной последовательности являются смежными и находятся в фазе считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными.

Вектор

Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы»).

В одном аспекте настоящее изобретение настоящее изобретение относится к вектору, подходящему для экспрессии любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют нуклеазу PaCas9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеаза PaCas9 по данному изобретению экспрессируется путем вставки ДНК в экспрессионные вектора, таким образом, что гены функционально соединены с необходимыми последовательностями, контролирующими экспрессию, такими как транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности. Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, λ AC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена нуклеазы PaCas9 и вектора или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Помимо гена нуклеазы PaCas9, рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности,

которые контролируют экспрессию гена нуклеазы PaCas9 в клетке – хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки –хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки –хозяина млекопитающих включают вирусные элементы обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора /энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора /энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов млекопитающих, таких как промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина. Для дальнейшего описания вирусных регулирующих элементов и их последовательностей см., например, патенты США 5,168,062, 4,510,245 и 4,968,615. Методы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например, дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области техники.

В дополнение к гену нуклеазы PaCas9 и регулирующим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках – хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селектируемого маркера. Ген селектируемого маркера облегчает селекцию клеток – хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, обычно ген селектируемого маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке – хозяину, в которую вектор введен. Например, гены селектируемого маркера включают ген дигидрофолат редуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках –хозяевах при селекции /амплификации метотрексата), ген нео (для селекции G418) и ген синтетазы глутамата.

Термин «последовательность контроля экспрессии», используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких

контролирующих последовательностей различается в зависимости от организма –хозяина ; в прокариотах такие контролирующие последовательности , как правило , включают промотор , сайт связывания рибосомы , а также последовательности терминации транскрипции ; в эукариотах , как правило , такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции . Термин «контролирующие последовательности » включает , как минимум , все компоненты , наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга , и может также включать дополнительные компоненты , чье присутствие является полезным , например , лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток .

Клетки - хозяева

Термин «рекомбинантная клетка –хозяин » (или просто «клетка –хозяин ») при использовании в данном документе означает клетку , в которую введен рекомбинантный экспрессионный вектор . Настоящее изобретение относится к клеткам –хозяевам , которые могут включать , например , вектор в соответствии с настоящим изобретением , описанным выше . Следует понимать , что «рекомбинантная клетка –хозяин » и «клетка –хозяин » означают не только конкретную заявленную клетку , но также и потомство такой клетки . Поскольку модификации могут проходить в последующих поколениях вследствие мутации или воздействий окружающей среды , такое потомство не может , на самом деле , быть идентичным родительской клетке , но такие клетки по-прежнему включены в объем термина «клетка –хозяин » при использовании в настоящем документе .

Молекулы нуклеиновой кислоты , кодирующие нуклеазу PaCas9 по изобретению , и векторы , содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты , могут быть использованы для трансфекции подходящего млекопитающего или его клетки , растения или его клетки , бактериальной или дрожжевой клетки –хозяина . Преобразование может происходить любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку –хозяина . Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают декстран –опосредованную трансфекцию , трансфекцию комплексом нуклеиновой кислоты и позитивно заряженного полимера , трансфекцию преципитатом нуклеиновой кислоты и фосфата кальция , полибрен –опосредованную трансфекцию , слияние протопластов , трансфекцию инкапсулированными в липосомы полинуклеотидами и прямую микроинъекцию ДНК в ядра . В дополнение , молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих вирусными векторами . Способы трансфекции клеток хорошо известны в данной области техники . См. , например , патенты США , 4,399,216 , 4,912,040 , 4,740,461 и 4,959,455 . Способы трансформации клеток растений хорошо известны в данной области , включая , например , Agrobacterium- опосредованную трансформацию , биолистическую трансформацию , прямую инъекцию , электропорацию и вирусную

трансформацию . Методы трансформации клеток бактерий и дрожжей также хорошо известны в данной области .

Клеточные линии млекопитающих , используемые в качестве хозяев для трансформации , хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных доступных клеточных линий . К ним относятся , например , клетки яичников китайского хомячка (CHO) , NS0 клетки , клетки SP2 , HEK-293T клетки , 293 Фристайл клетки (Invitrogen) , NIH-3T3 клетки , клетки HeLa, клетки почек хомячка (ВНК) , клетки почек африканских зеленых мартышек (COS) , клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например , Hep G2) , A549 клетки и ряд других клеточных линий . Клеточные линии выбираются путем определения , какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии и обеспечивают необходимые характеристики продуцируемого белка . Другими клеточными линиями , которые могут быть использованы , являются клеточные линии насекомых , такие как Sf9 или Sf21 клетки . Когда векторы рекомбинантной экспрессии , кодирующие нуклеазу PaCas9, вводятся в клетки -хозяева млекопитающих , нуклеаза PaCas9 продуцируется путем культивирования клеток -хозяев в течение времени , достаточного для экспрессии нуклеазы PaCas9 в клетках -хозяевах или , предпочтительнее , выделения нуклеазы PaCas9 в питательную среду , в которой выращиваются клетки -хозяева . Нуклеаза PaCas9 может быть выделена из питательной среды с использованием стандартных методов очистки белка . Клетки -хозяева растений , например , включают *Nicotiana*, *Arabidopsis*, являющуюся , кукурузу , пшеницу , картофель и т.д . Клетки бактерий хозяина включают виды *Escherichia* и *Streptomyces* . Дрожжевые клетки -хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того , уровень продукции нуклеазы PaCas9 по данному изобретению из продуцирующей клеточной линии можно усилить с помощью ряда известных методов . Например , система экспрессии гена глутамин синтетазы (система GS) является достаточно распространенной для усиления экспрессии при определенных условиях . Система GS обсуждается в целом или частично в связи с патентами EP 0216846, 0256055, 0323997 и 0338841.

Вполне вероятно , что нуклеаза PaCas9, полученная из различных клеточных линий или трансгенных животных , будет отличаться друг от друга профилем гликозилирования . Однако нуклеаза PaCas9, кодируемая молекулами нуклеиновой кислоты , описанными в данном документе , является частью данного изобретения , независимо от состояния гликозилирования и в целом , независимо от наличия или отсутствия пост -трансляционных модификаций .

Липосома

В одном аспекте настоящее изобретение настоящее изобретение относится к липосомам , в которые инкапсулирована нуклеаза PaCas9 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или выделенная

молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует нуклеазу PaCas9, с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Липосомы – это микроскопические замкнутые везикулы, имеющие внутреннюю фазу, окруженную одним или несколькими липидными бислоями, и способные удерживать водорастворимый материал во внутренней фазе, а маслорастворимый материал – в фосфолипидном бислое. При заключении активного вещества в липосому и доставке его в ткани-мишени, важными задачами являются высокоэффективный захват активного соединения в липосому и обеспечение устойчивого удержания активного соединения липосомой.

В целом, считается, что липосома представляет собой частицу с преимущественным размером от нескольких десятков нанометров вплоть до десятых долей микрон, внутри оболочки которой, располагаются молекулы другого вещества (веществ). Оболочка липосом является «полупроницаемой» для молекул воды и ионов.

Для липосом характерна способность включать в себя и удерживать вещества различной природы. Круг веществ, включаемых в липосомы, достаточно широк – от неорганических ионов и низкомолекулярных органических соединений до крупных белков и нуклеиновых кислот.

Липосомы обеспечивают пролонгированное высвобождение заключенного в носителе вещества.

Липосомы могут быть выполнены из фосфолипида, в частности из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, фосфатидилглицерина, фосфатидовой кислоты, сфингофосфолипида, фосфолипидов яиц или соевых бобов или их смесей.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New

York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей .

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов , созданных путем химического синтеза . Генные сегменты длиной от 300 до 4000 т.п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции , собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов , включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции . Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК .

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сенгеру .

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях

Применяли пакет программ фирмы Infomax's Vector NTI Advance suite, версия 8.0 для создания , картирования , анализа , аннотирования и иллюстрации последовательностей .

Экспрессионные векторы

Для экспрессии нуклеазы PaCas9 использовали варианты экспрессионных плазмид , предназначенных для экспрессии в клетках прокариот (*E. coli*), кратковременной экспрессии в клетках эукариот (например , в клетках CHO). Помимо кассеты экспрессии нуклеазы PaCas9 векторы содержали : сайт инициации репликации , обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в *E. coli*, гены , придающие устойчивость в *E. coli* к различным антибиотикам (например , к ампициллину и/или канамицину).

Пример 1

Способ получения нуклеазы PaCas9

Для получения метагеномных последовательностей образцы губок *Homoeodictya palmata* собирали с участков Белого моря , материал фракционировали центрифугированием , после чего производилось выделение тотальной ДНК и ее последующее секвенирование .

В метагеномных последовательностях биоинформатическими методами была обнаружена открытая рамка считывания белка PaCas9, а также находящиеся по соседству остальные компоненты CRISPR Cas системы : CRISPR кассета , а также последовательности crRNA и tracrRNA.

ДНК нуклеазы PaCas9 представлена в SEQ ID NO:1.

Аминокислотная последовательность нуклеазы PaCas9 представлена в SEQ ID NO: 2 .

Нуклеотидная последовательность , кодирующая tracrRNA, представлена в SEQ ID NO: 3.

Нуклеотидная последовательность , кодирующая прямой повтор DR, представлена в SEQ ID NO: 4.

Пример 2

Описание клонирования

Последовательность гена нуклеазы PaCas9 была получена биоинформатическим поиском. Последовательность была кодон-оптимизирована для обеспечения оптимальной экспрессии в клетках млекопитающих, после чего собрана de novo из химически синтезированных олигонуклеотидов по методу Гибсона. Синтезированный ген PaCas9 был заклонирован в генетическую конструкцию с 3'-конца от промотора CMV. С 5'-конца гена были добавлены последовательности Kozak и сигналы ядерной локализации (NLS), а с 3'-конца – последовательность эпитопа FLAG для детекции белка. После последовательности PaCas9 и относящихся к ней перечисленных выше элементов, в конструкции в той же рамке считывания помещены элементы T2A и открытая рамка считывания зелёного флуоресцентного белка (EGFP) в качестве маркера экспрессии.

После рамок считывания с 3'-конца помещена последовательность поли-A сигнала тимидинкиназы для повышения стабильности мРНК. В области бактериального кода генетической конструкции находится тандем из двух кассет для экспрессии малых молекул РНК. Каждая кассета содержит U6 промотор и терминатор транскрипции РНК полимеразы III. Данные кассеты необходимы для экспрессии молекул РНК, которые обеспечивают специфичное взаимодействие белка PaCas9 с целевой молекулой ДНК (клеточным геномом). Карта конструкции приведена на Фиг. 1. Данная конструкция позволяет экспрессировать в клетках эукариот одновременно как белок PaCas9 (который благодаря NLS транспортируется в ядро), так и направляющие его молекулы РНК (направляющие РНК), а также детектировать белок по эпитопу FLAG и определять эффективность доставки генетической конструкции по детекции EGFP.

Пример 3

Ферментативная активность белка PaCas9

Аминокислоты, участвующие в ферментативном гидролизе ДНК/РНК, были выявлены с помощью сравнения гомологии доменов HNH и RuvC различных белков семейства Cas9 с доменами PaCas9 (распределение по доменам указано на Фиг. 2). Консервативные аминокислоты, для которых ранее было показано участие в ферментативной активности белков Cas9, были выделены в PaCas9. Таким образом, аналитическими методами было установлено, что необходимыми для ферментативной активности белка PaCas9 являются аминокислотные остатки данного белка (аминокислота – положение): D 9; E 527; H 750; D 753; H 613; N 636.

Пример 4

Определение ферментативной активности белка PaCas9

Для определения PAM последовательности ((Protospacer Adjacent Motif) – последовательность , прилегающая к протоспейсеру) проведены *in vitro* реакции разрезания библиотек ДНК с рекомбинантным белком – нуклеазой (SEQ ID NO: 2), crRNA (состоит из вариабельной части , зависящей от мишени , и последовательности прямого повтора , представленной в SEQ ID NO: 4) и tracrRNA (SEQ ID NO: 3) . Библиотека ДНК – ПЦР фрагмент , содержащий семибуквенную рандомизированную последовательность , и узнаваемую последовательность , протоспейсер .

После инкубации PaCas9–РНК–белкового комплекса с библиотекой ДНК продукты реакции наносятся на гель –электрофорез . Не порезанные фрагменты экстрагируются из геля и подвергаются секвенированию на платформе Illumina. Сравнение PAM последовательностей , содержащихся в не порезанных продуктах реакции PaCas9 и контрольной реакции , позволят определить PAM исследуемого белка .

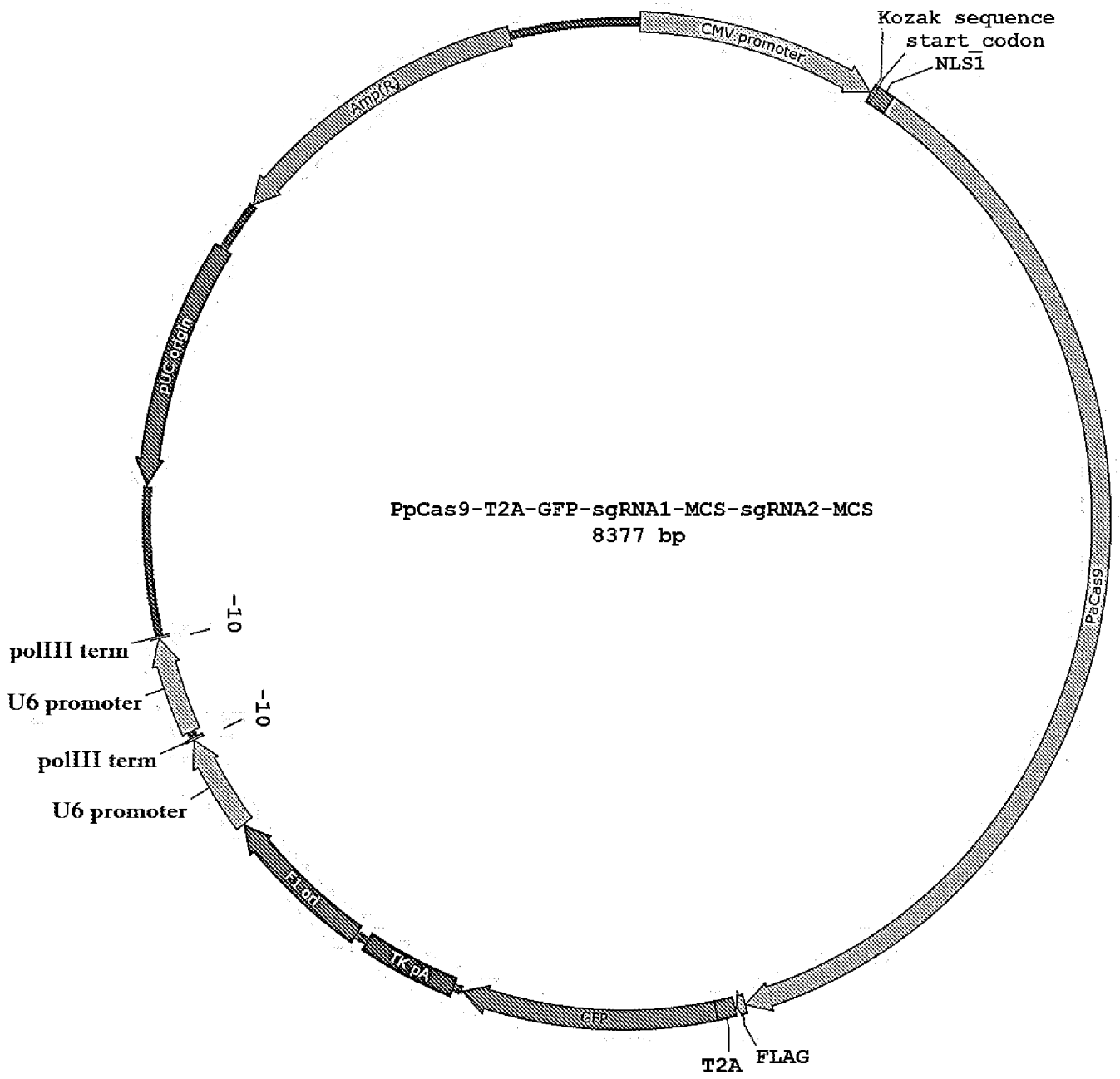
После выявления PAM последовательности , проводится оценка активности нуклеазы *in vitro*. Для этого белок в комплексе с направляющими РНК инкубируется с ДНК–фрагментом , несущим последовательность протоспейсера и выявленный PAM . Определено оптимальное соотношение РНК–белкового комплекса к разрезаемой ДНК . Оценка активности нуклеазы определена исходя из количества белка PaCas9, необходимого для 50% разрезания 200 нг ДНК мишени , длиной около 400 пар нуклеотидов , содержащей оптимальный PAM .

Таким образом , подтверждено , что нуклеаза PaCas9 обладает ферментативной активностью и создает двуцепочечный разрыв в ДНК .

Более того , подтверждено что нуклеаза PaCas9 способна создавать двуцепочечный разрыв в ДНК с высокоспецифичным сайтом узнавания (16–20 букв) .

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеаза PaCas9 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2.
2. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует нуклеазу PaCas9 по п.1, с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1.
3. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.2.
4. Экспрессионный вектор по п.3, который представляет собой генетическую конструкцию, указанную на фиг. 1.
5. Экспрессионный вектор для доставки терапевтического агента, содержащего нуклеиновую кислоту по п.2.
6. Экспрессионный вектор по п.5, где терапевтический агент доставляется в клетки-мишени или ткани-мишени.
7. Способ доставки в клетки-мишени или ткани-мишени терапевтического агента, который включает введение вектора по любому из пп. 3-6 в клетки-мишени или ткани-мишени.
8. Способ получения клетки-хозяина для получения нуклеазы PaCas9 по п.1, включающий трансформирование клетки вектором по любому из пп. 3-6.
9. Клетка-хозяин для получения нуклеазы PaCas9 по п.1, содержащая нуклеиновую кислоту по п.2.
10. Способ получения нуклеазы PaCas9 по п.1, заключающийся в культивировании клетки-хозяина по п.9 в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанной нуклеазы PaCas9, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученной нуклеазы PaCas9.



Фиг. 1

RuvC I
 PaCas9 1 MAKTRLGIDMGNTNSIGWMLYELDKNGEISEVLKAGVRIFPDGREDKTQASKNAARRVARM

 PaCas9 61 NRRQRDRYLQRRTAILRVLVVFGLMPEDKTEQRKLDIDPYSIRAKAMEEEIIPPHLGRA

 PaCas9 121 IFHISQRRGYKSSRRNEENDKDGPFVKSSIEEFRRQLGDKSVGQFLSELHQENKPIRARRD

 PaCas9 181 GVTNNDLFHYFPDRELIEKEFNDIWQKQQQIRSQQPDKNKQILSDILTNNKQTLFEVIF

 Rec lobe
 PaCas9 241 HQRSCLKPPIIGNCQFFPTKKRIAKALPSFQRFRIQDINNLEYFDENEWHPLPSSIRDWA

 PaCas9 301 LHILFAGGNLTFKKLNSQMKKDGGEINESAFFNLEDEKRNDIKGDFTTKTMKEIIPALWDN

 PaCas9 361 WDLHKQDSMILLIGDKSIDEDKMLDEKMLDELS SHYNLSEEEAQECANANIDNRQGVN

 PaCas9 421 GRASLSLEAISILIPYLEKGNHYDKALAESGIEKDKSSKHDDHFYMQPYPEILGQWCLPR

 RuvC II
 PaCas9 481 KSEDESINKELWRI PNPTVHVALNQLRAVVNDICIRINGGEKPSQVVVELARDLPIGIATRQ

 PaCas9 541 EIRKKQSENQRARTQRRNKIEELGERASAKSMLRMQLWEESSPKNANNHCCLYCGKQIGC

 HNH
 PaCas9 601 AAVSSPDFEIDHILPFSKTLDDSAANKTLCCVQCNREKGNKTPYEAWGSNEKRYDEIKT

 PaCas9 661 RASALSPKKRRRFLPDAMKHFDDGNDFLARQLTDTQYIAKVTKRYFESIIPNDVYVIPG

 RuvC III
 PaCas9 721 RLTEILRRKWGLNINLNDGHNRRDHRHHAVDAAVIGATTRSTLQKFATEAGKDNSDLP

 PaCas9 781 NVSITAPMKVFRKVEKTVKNIVVSHKPDREFSGALHNDTAYGLPADYKEGAGAQFVRHR

 PaCas9 841 IMLSDITTFNSQKVVNSFLREELKTLCDYATDKKSLDQELKRYGEKNNIRRVLIEEKLSV

 PaCas9 901 IAVCDKDGKPYKGYKSDSNWAYEIFEKFPNGNWDGEIISTFNANQEKFTPLWKEKNPKAK

 PaCas9 961 LIMRLHKNDMVALDDNGLRKCIVKTLASASKIAMVEHFDPGRNPPTIITKSPNEFRKI

 PaCas9 1021 NGRKIHISPGGLVRDTHKDGSRNH

Фиг. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2019/050154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/22 (2006.01); C07K 14/435 (2016.01); C12N 15/52 (2016.01); C12N 15/79 (2016.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/22, 15/52, 15/79, C07K 14/435, A61K 9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, K-PION, Espacenet, Information Retrieval System of FIPS, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/048969 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23.03.2017, par. [0007], [0044], [00454], [00600]-[00606], [00620], [00621], [00641], [00648], the claims	1, 3-6, 8-10
A	RU 2634395 C1 (FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE AVTONOMNOE OBRAZOVATELNOE UCHREZHDENIE VYSSHEGO PROFESSIONALNOGO OBRAZOVANIYA «BALTYSKY FEDERALNY UNIVERSITET IMENI IMMANUILA KANTA») 26.10.2017, p. 4-5	2
A	RU 2650819 C2 (SANGAMO TERAPJUTIKS, INK. et al.) 17.04.2018, par. [0015], [0099], [0115], [0184]-[0185]	7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 December 2019 (24.12.2019)

Date of mailing of the international search report

09 January 2020 (09.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки
PCT/RU 2019/050154

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ
C12N 9/22 (2006.01)
C07K 14/435 (2016.01)
C12N 15/52 (2016.01)
C12N 15/79 (2016.01)
Согласно Международной патентной классификации МПК

B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)
C12N 9/22, 15/52, 15/79, C07K 14/435, A61K 9/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, K-PION, Espacenet, Information Retrieval System of FIPS, PubMed

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2017/048969 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23.03.2017, абзацы [0007], [0044], [00454], [00600]-[00606], [00620], [00621], [00641], [00648], формула	1, 3-6, 8-10
A	RU 2634395 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИММАНУИЛА КАНТА») 26.10.2017, с. 4-5	2
A	RU 2650819 C2 (САНГАМО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. и др.) 17.04.2018, абзацы [0015], [0099], [0115], [0184]-[0185]	7

последующие документы указаны в продолжении графы C. данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:	“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	

Дата действительного завершения международного поиска 24 декабря 2019 (24.12.2019)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 09 января 2020 (09.01.2020)
---	---

Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37	Уполномоченное лицо: Вороная А. Телефон № 8(495)-531-64-81
---	---