

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041935**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.16

(21) Номер заявки
202290026

(22) Дата подачи заявки
2020.06.30

(51) Int. Cl. **C12Q 1/68** (2018.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

(54) **СРЕДСТВО РАЗРЕЗАНИЯ ДНК НА ОСНОВЕ Cas9 БЕЛКА ИЗ БАКТЕРИИ Pasteurella Pneumotropica**

(31) **2019118061**

(32) **2019.06.11**

(33) **RU**

(43) **2022.03.05**

(86) **PCT/RU2020/050137**

(87) **WO 2020/251413 2020.12.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ
ОБЩЕСТВО "БИОКАД" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Северинов Константин Викторович,
Шмаков Сергей Анатольевич,
Артамонова Дарья Николаевна,
Горянин Игнатий Игоревич,
Мушарова Ольга Сергеевна,
Андреева Юлия Валерьевна, Зюбко
Татьяна Игоревна, Федорова Яна
Витальевна, Ходорковский Михаил
Алексеевич, Побегалов Георгий
Евгеньевич, Арсениев Анатолий
Николаевич, Селькова Полина
Анатольевна, Васильева Александра
Андреевна, Артамонова Татьяна
Олеговна, Абрамова Марина
Викторовна (RU)**

(74) Представитель:
Мельчаева О.А. (RU)

(56) ASTRID WENINGER et al. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology. Elsevier. Volume 235, 10 October 2016, Pages 139-149

A. VASILEVA et al. *Pasteurella pneumotropica* and *Demequina sediminicola* Cas9 orthologs characterization. 14.01.2020, Found in Internet: https://2019.febscongress.org/abstract_previ ew.aspx?idAbstractEnc=4424170094096092094091424170

(57) Изобретение описывает новую бактериальную нуклеазу системы CRISPR-Cas9 из бактерии *P. pneumotropica*, а также ее применение для образования строго специфичных двунитевых разрывов в молекуле ДНК. Данная нуклеаза обладает необычными свойствами и может быть использована в качестве инструмента для внесения изменений в строго определенных местах в последовательности геномной ДНК одноклеточных или многоклеточных организмов. Таким образом, достигается повышение универсальности доступных систем CRISPR-Cas9, что позволит использовать нуклеазы Cas9 из различных организмов для разрезания геномной или плазмидной ДНК в большем количестве специфических сайтов и при различных условиях.

041935 B1

041935 B1

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к новым ферментам Cas нуклеазам систем CRISPR-Cas, применяемым для разрезания ДНК и редактирования генома различных организмов. Данная технология может применяться в будущем для генной терапии наследственных заболеваний человека, а также для редактирования генома других организмов.

Уровень техники

Изменение последовательности ДНК - одна из актуальных задач биотехнологии на сегодняшний день. Редактирование и изменение геномов эукариотических и прокариотических организмов, а также манипуляции с ДНК *in vitro* требуют направленного внесения двунитевых разрывов в последовательности ДНК.

Для решения этой задачи в настоящее время используют следующие методики: искусственные нуклеазные системы, содержащие домены типа "цинковые пальцы", TALEN-системы и бактериальные CRISPR-Cas системы. Первые два метода требуют трудозатратой оптимизации аминокислотной последовательности нуклеазы для узнавания конкретной последовательности ДНК. В отличие от них в случае CRISPR-Cas систем структурами, узнающими ДНК-мишень, являются не белки, а короткие направляющие РНК. Разрезание конкретной ДНК-мишени не требует синтеза нуклеазы или ее гена *de novo*, а обеспечивается за счет использования направляющих РНК, комплементарных целевой последовательности. Это делает CRISPR Cas системы удобными и эффективными инструментами разрезания различных ДНК-последовательностей. Методика позволяет осуществлять одновременное разрезание ДНК в нескольких участках при использовании направляющих РНК разных последовательностей. Такой подход используется в том числе для одновременного изменения нескольких генов в эукариотических организмах.

По своей природе CRISPR-Cas системы являются иммунными системами прокариот, способными высокоспецифично вносить разрывы в генетический материал вирусов (Mojica F.J.M. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // *Journal of molecular evolution*. - 2005. - Vol. 80. - No. 2. - P. 174-182). Аббревиатура CRISPR-Cas расшифровывается как "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR associated genes" (Jansen R. et al. identification of genes that are associated with DMA repeats in prokaryotes // *Molecular microbiology*. - 2002. - Vol. 43. - No. 8. - P. 1565-1575), что в переводе с английского обозначает "короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, и ассоциированные с ними гены". Все CRISPR-Cas системы состоят из CRISPR каскет и генов, кодирующих различные Cas белки (Jansen R. et al., *Molecular microbiology*. - 2002. - Vol. 43. - No. 6. - P. 1565-1575). CRISPR каскеты состоят из последовательностей-спейсеров, каждая из которых имеет уникальную нуклеотидную последовательность, и повторяющихся палиндромных повторов (Jansen R. et al., *Molecular microbiology*. - 2002. - Vol. 43. - No. 6. - P. 1565-1575). В результате транскрипции CRISPR каскет и их последующего процессинга образуются направляющие крРНК, которые вместе с Cas белками формируют эффекторный комплекс (Brouns S.J.J. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // *Science*. - 2008. - Vol. 321. - No. 5891. - P. 960-984). За счет комплементарного спаривания крРНК с целевым участком ДНК, именуемым протоспейсером, Cas-нуклеаза узнает ДНК-мишень и высокоспецифично вносит в нее разрыв.

CRISPR-Cas системы, представленные одиночным белком-эффектором, разделяют на шесть различных типов (от I до VI) в зависимости от Cas белков, входящих в состав систем. В 2013 году впервые было предложено использовать систему CRISPR-Cas9, относящуюся к типу II, для редактирования геномной ДНК клеток человека (Cong L., et al., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15; 339(6121):819-23). Система CRISPR-Cas9 II типа отличается простотой состава и механизма работы: для ее функционирования необходимо формирование эффекторного комплекса, состоящего лишь из одного белка Cas9 и двух коротких РНК: крРНК (crRNA) и трейсерной РНК (tracrRNA). Трейсерная РНК комплементарно спаривается с участком крРНК, происходящим из CRISPR повтора, образуя вторичную структуру, необходимую для связывания направляющих РНК с Cas эффектом. Определение последовательности направляющих РНК является важным шагом в характеристике неизученных ранее Cas-ортологов. Эффекторный белок Cas9 является РНК-зависимой ДНК эндонуклеазой с двумя нуклеазными доменами (HNH и RuvC), вносящими разрывы в комплементарные нити целевой ДНК, таким образом образуя двунитевой разрыв ДНК (Deitcheva E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // *Nature*. - 2011. - Vol. 471. - No. 7340. - P. 602).

На сегодняшний день известно несколько CRISPR-Cas нуклеаз, способных направлено и специфично вносить двунитевые разрывы в ДНК. Технология CRISPR-Cas9 является одной из самых современных и быстроразвивающихся методик внесения разрывов в ДНК различных организмов, начиная от бактериальных штаммов и заканчивая клетками человека, а также *in vitro* (Song M. The CRISPR/Cas9 system: Their delivery, *in vivo* and *ex vivo* applications and clinical development by startups. *Biotechnol Prog*. 2017 Jul; 33(4):1035-1045).

Эффекторному рибонуклеиновому комплексу, состоящему из Cas9 и дуплекса крРНК и тракрРНК, для распознавания и последующего гидролиза ДНК, помимо комплементарного соответствия спейсера крРНК и протоспейсера, необходимо присутствие PAM (от англ. "PAM" - protospacer adjusted motif) на

ДНК мишени (Mojica F.J.M. et al., 2009). PAM представляет собой строго определенную последовательность из нескольких нуклеотидов, расположенных в системах типа II вплотную либо в нескольких нуклеотидах от 3'-конца протоспейсера на нетаргетной цепи. При отсутствии PAM гидролиза связей в ДНК с образованием двунитевого разрыва не происходит. Необходимость присутствия PAM последовательности на мишени повышает специфичность узнавания, но в то же время накладывает ограничение в выборе целевых участков ДНК, в которые необходимо внести разрыв. Таким образом, наличие нужной PAM последовательности, фланкирующей ДНК-мишень с 3'-конца, является характеристикой, ограничивающей применение CRISPR-Cas систем на любых участках ДНК.

Различные CRISPR-Cas белки используют для своей работы разные, оригинальные PAM последовательности. Использование CRISPR-Cas белков с новыми разнообразными PAM последовательностями необходимо для обеспечения возможности изменения любого участка ДНК, как *in vitro*, так и в геноме живых организмов. Изменение эукариотических геномов также требует использования нуклеаз малого размера для обеспечения доставки CRISPR-Cas систем в клетки посредством AAV вирусов.

Несмотря на известность ряда способов разрезания ДНК и изменения последовательности геномной ДНК, на сегодняшний день сохраняется потребность в новых эффективных инструментах для модификации ДНК в различных организмах и в строго определенных местах последовательности ДНК.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание новых инструментов для изменения последовательности геномной ДНК одноклеточных или многоклеточных организмов на основе систем CRISPR-Cas9. Существующие в настоящее время системы имеют ограниченное применение из-за специфичной последовательности PAM, которая должна присутствовать на 3'-конце участка ДНК, подвергающегося модификации. Поиск новых ферментов Cas9 с другими PAM последовательностями позволит расширить арсенал имеющихся средств для образования двунитевого разрыва в необходимых, строго определенных местах в молекулах ДНК разных организмов. Для решения этой задачи авторами была охарактеризована ранее предсказанная для бактерии *Pasteurella pneumotropica* (*P. pneumotropica*) CRISPR нуклеаза II типа PpCas9, которая может быть применена для внесения направленных изменений в геном как этого, так и других организмов. Существенными признаками, отличающими настоящее изобретение, являются (а) короткая, отличающаяся от других известных последовательность PAM; (б) относительно малый размер охарактеризованного белка PpCas9 - 1055 аминокислотных остатков (а.о.).

Указанная задача решается путем применения белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и имеет отличия по сравнению с SEQ ID NO: 1 только в неконсервативных аминокислотных остатках, для образования двунитевого разрыва в молекуле ДНК, расположенного непосредственно перед нуклеотидной последовательностью 5'-NNNN(A/G)T-3' в указанной молекуле ДНК. В некоторых вариантах изобретения данное применение характеризуется тем, что образование двунитевого разрыва в молекуле ДНК происходит при температуре от 35 до 45°C.

Указанная задача также решается путем создания способа изменения последовательности геномной ДНК одноклеточного или многоклеточного организма, включающего введение по меньшей мере в одну клетку этого организма эффективного количества а) либо белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, либо нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и б) либо направляющей РНК, содержащей последовательность, образующую дуплекс с нуклеотидной последовательностью участка геномной ДНК организма, непосредственно примыкающей к нуклеотидной последовательности 5'-NNNN(A/G)T-3', и взаимодействующей с указанным белком после образования дуплекса, либо последовательности ДНК, кодирующей указанную направляющую РНК; при этом взаимодействие указанного белка с направляющей РНК и нуклеотидной последовательностью 5'-NNNN(A/G)T-3' приводит к образованию двунитевого разрыва в последовательности геномной ДНК, непосредственно примыкающей к последовательности 5'-NNNN(A/G)T-3'. В некоторых вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что дополнительно включает введение экзогенной последовательности ДНК одновременно с направляющей РНК.

В качестве направляющей РНК может быть использована смесь из крРНК (crRNA) и трейсерной РНК (tracrRNA), способных образовать комплекс с участком целевой ДНК и белком PpCas9. В предпочтительных вариантах изобретения в качестве направляющей РНК может быть использована гибридная РНК, сконструированная на основе крРНК и трейсерной РНК. Методы конструирования гибридной направляющей РНК известны специалистам (Hsu P.D., et al., DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2013 Sep; 31(9):827-32). Один из вариантов конструирования гибридной РНК раскрыт в примерах ниже.

Изобретение может быть использовано как для разрезания целевой ДНК *in vitro*, так и для модификации генома какого-либо живого организма. Модификация генома может проводиться прямым способом - разрезанием генома в соответствующем сайте, а также вставкой экзогенной последовательности ДНК за счет гомологичной репарации.

В качестве экзогенной последовательности ДНК может быть использован любой участок двуните-

вой или односторонней ДНК из генома организма, отличного от организма, используемого при введении (или смесь таких участков между собой и с другими фрагментами ДНК), при этом этот участок (или смесь участков) предназначен для интеграции в место двухцепочечного разрыва в целевой ДНК, образованного под действием нуклеазы PpCas9. В некоторых вариантах изобретения в качестве экзогенной последовательности ДНК может быть использован участок двухцепочечной ДНК из генома организма, используемого при введении белка PpCas9, но при этом измененный мутациями (заменой нуклеотидов), а также вставками или делециями одного или нескольких нуклеотидов.

Техническим результатом настоящего изобретения является повышение универсальности доступных систем CRISPR-Cas9, позволяющее использовать нуклеазу Cas9 для разрезания геномной или плазмидной ДНК в большем количестве специфических сайтов и специфических условий.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схема устройства локуса CRISPR PpCas9 системы. DR - direct repeat, или прямой повтор - регулярно повторяющийся участок, входящий в состав CRISPR кассеты.

Фиг. 2. ПAM скрининг in vitro. Схема эксперимента.

Фиг. 3. Разрезание нуклеазой PpCas9 фрагментов 7N библиотеки при разных температурах проведения реакции.

Фиг. 4. (А) Анализ результатов in vitro скрининга нуклеазы PpCas9 с использованием расчета логарифма изменения доли каждого конкретного нуклеотида в каждой позиции PAM (FC). (Б) PAM Logo нуклеазы PpCas9. Для каждой позиции обозначены частоты представленности аденина, цитозина, тимина и гуанина. Высота букв соответствует частоте представленности нуклеотида в данной позиции PAM последовательности.

Фиг. 5. Проверка влияния однонуклеотидных замен в первой позиции PAM на эффективность разрезания нуклеазой PpCas9 ДНК-мишени.

Фиг. 6. Проверка значимости нуклеотидных позиций в PAM последовательности PpCas9.

Фиг. 7. Проверка влияния замены А на G в 6-й позиции PAM на эффективность разрезания нуклеазой PpCas9 ДНК-мишени.

Фиг. 8. Проверка влияния однонуклеотидных замен в 7-й позиции PAM на эффективность разрезания нуклеазой PpCas9 ДНК-мишени.

Фиг. 9. Разрезание различных сайтов ДНК с помощью белка PpCas9. Дорожки 1 и 2 - положительный контроль.

Фиг. 10. Проверка распознавания нуклеазой PpCas9 PAM последовательности CAGCATT. Дорожки 1 и 2 - положительный контроль.

Фиг. 11. Схема инструмента разрезания ДНК PpCas9.

Фиг. 12. Эксперимент по разрезанию ДНК-мишени. Используются гибридные направляющие РНК разной длины.

Фиг. 13. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков PpCas9 и Cas9 из *Staphylococcus aureus* при помощи программы NCBI BLASTp (default parameters).

Подробное раскрытие изобретения

В описании данного изобретения термины "включает" и "включающий" интерпретируются как означающие "включает, помимо всего прочего". Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как "состоит только из". Если не определено отдельно, технические и научные термины в данном документе имеют стандартные значения, общепринятые в научной и технической литературе.

Используемый здесь термин "процент гомологии двух последовательностей" эквивалентен термину "процент идентичности двух последовательностей". Идентичность последовательностей определяется на основании референсной последовательности. Алгоритмы для анализа последовательности известны в данной области, такие как BLAST, описанный в Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215, p. 403-10 (1990). Для целей настоящего изобретения для определения уровня идентичности и сходства между нуклеотидными последовательностями и аминокислотными последовательностями может быть использовано сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, производимое с помощью пакета программ BLAST, предоставляемого National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) с использованием содержащего разрывы выравнивания со стандартными параметрами. Процент идентичности двух последовательностей определяется числом положений идентичных аминокислот в этих двух последовательностях с учетом числа пробелов и длины каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального сопоставления двух последовательностей путем выравнивания. Процент идентичности равен числу идентичных аминокислот в данных положениях с учетом выравнивания последовательностей, разделенному на общее число положений и умноженному на 100.

Термин "специфически гибридизуется" относится к ассоциации между двумя одноцепочечными молекулами нуклеиновых кислот или в достаточной степени комплементарными последовательностями, что разрешает такую гибридизацию в предопределенных условиях, обычно использующихся в данной области.

Фраза "двунитевой разрыв, расположенный непосредственно перед нуклеотидной последователь-

ностью РАМ" означает, что двунитевой разрыв в целевой последовательности ДНК будет произведен на расстоянии от 0 до 25 нуклеотидов перед нуклеотидной последовательностью РАМ.

Под экзогенной последовательностью ДНК, вводимой одновременно с направляющей РНК, следует понимать последовательность ДНК, подготовленную специально для специфической модификации двухцепочечной целевой ДНК в месте разрыва, определяемого специфичностью направляющей РНК. Подобной модификацией может быть, например, вставка или делеция определенных нуклеотидов в месте разрыва целевой ДНК. Экзогенной ДНК может служить как участок ДНК из другого организма, так и участок ДНК из того же организма, что и целевая ДНК.

Под белком, содержащим определенную аминокислотную последовательность, следует понимать белок, имеющий аминокислотную последовательность, составленную из указанной аминокислотной последовательности и, возможно, других последовательностей, соединённых пептидными связями с указанной аминокислотной последовательностью. Примером других последовательностей может служить последовательность сигнала ядерной локализации (NLS) или другие последовательности, обеспечивающие повышенную функциональность для указанной аминокислотной последовательности.

Под экзогенной последовательностью ДНК, вводимой одновременно с направляющей РНК, следует понимать последовательность ДНК, подготовленную специально для специфической модификации двухцепочечной целевой ДНК в месте разрыва, определяемого специфичностью направляющей РНК. Подобной модификацией может быть, например, вставка или делеция определенных нуклеотидов в месте разрыва целевой ДНК. Экзогенной ДНК может служить как участок ДНК из другого организма, так и участок ДНК из того же организма, что и целевая ДНК.

Под эффективным количеством вводимых в клетку белка и РНК следует понимать такое количество белка и РНК, которое при попадании в указанную клетку будет способно образовать функциональный комплекс, т.е. комплекс, который будет специфически связываться с целевой ДНК и производить в ней двунитевой разрыв в месте, определяемом направляющей РНК и РАМ последовательностью на ДНК. Эффективность этого процесса может быть оценена при помощи анализа целевой ДНК, выделенной из указанной клетки с помощью стандартных методов, известных специалистам.

Доставка белка и РНК в клетку может быть осуществлена различными способами. Например, белок может быть доставлен в виде ДНК-плазмиды, которая кодирует ген этого белка, как мРНК для трансляции этого белка в цитоплазме клетки или как рибонуклеопротеидный комплекс, включающий этот белок и направляющую РНК. Доставка может быть осуществлена различными методами, известными специалистам.

Нуклеиновая кислота, кодирующая компоненты системы, может быть введена в клетку, непосредственно или опосредованно, за счет трансфекции или трансформации клеток известными специалистам способами, за счет использования рекомбинантного вируса, за счет манипуляций с клеткой, таких как микроинъекция ДНК и т.п.

Доставка рибонуклеинового комплекса, состоящего из нуклеазы и направляющих РНК и экзогенной ДНК (при необходимости), может осуществляться путем трансфекции комплексов в клетку или за счет механического введения комплекса внутрь клетки, например микроинъекции.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, который необходимо ввести в клетку, может быть интегрирована в хромосому или может представлять собой внехромосомно реплицирующуюся ДНК. В некоторых вариантах для обеспечения эффективной экспрессии гена белка с вводимой в клетку ДНК необходимо изменить последовательность этой ДНК в соответствии с типом клетки в целях оптимизации кодонов при экспрессии, обусловленной неравномерностью частот встречаемости синонимичных кодонов в кодирующих областях генома различных организмов. Оптимизация кодонов необходима для увеличения экспрессии в клетках животных, растений, грибов или микроорганизмов.

Для функционирования белка, имеющего последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, в эукариотической клетке необходимо, чтобы этот белок оказался в ядре этой клетки. Поэтому в некоторых вариантах изобретения для образования двунитевых разрывов в целевой ДНК используют белок, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и который дополнительно модифицирован с одного или с обоих концов добавлением одного или нескольких сигналов ядерной локализации. Например, может быть использован сигнал ядерной локализации из вируса SV40. Для эффективной доставки в ядро сигнал ядерной локализации может быть отделен от основной последовательности белка спейсерной последовательностью, например, описанной в Shen B., et al. "Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting", Cell Res. 2013 May; 23(5):720-3. Также в других вариантах осуществления может быть использован другой сигнал ядерной локализации или альтернативный метод доставки указанного белка в ядро клетки.

Настоящее изобретение охватывает применение белка из организма *P. pneumotropica*, гомологичного ранее охарактеризованным белкам Cas9, для внесения двухцепочечных разрывов в молекулы ДНК в строго определенных положениях. Использование CRISPR нуклеаз для внесения направленных изменений в геном имеет ряд преимуществ. Во-первых, специфичность действия системы определяется последовательностью кРНК, что позволяет использовать один тип нуклеазы для всех локусов-мишеней. Во-

вторых, методика позволяет доставить в клетку сразу несколько направляющих РНК, комплементарных разным генам-мишеням, что позволяет осуществлять единовременное изменение сразу нескольких генов.

PpCas9 - Cas нуклеаза, найденная в бактериях *Pasteurella pneumotropica* ATCC 35149, являющихся патогенами грызунов, обитающих в легких животных. *Pasteurella pneumotropica* (*P. pneumotropica*) CRISPR Cas9 система (далее CRISPR PpCas9) относится к IIС типу CRISPR Cas систем и состоит из CRISPR кассеты, несущей четыре прямых повтора (direct repeats, DR) последовательностью 5'ATTATAGCACTGCGAAATGAAAAAGGGAGCTACAAC3' разделенных последовательностями уникальных спейсеров. Ни один из спейсеров системы не совпадает по последовательности с известными на сегодня бактериофагами или плазмидами, что не позволяет определить требуемый PpCas9 PAM биоинформатическим анализом. К CRISPR кассете прилегает ген эффекторного Cas9 белка PpCas9, а также гены белков Cas1 и Cas2, участвующих в адаптации, встраивании новых спейсеров. Рядом с Cas генами была обнаружена последовательность, частично комплементарная прямым повторам, складывающаяся в характерную вторичную структуру, - предполагаемая трейсерная РНК (tracrRNA) (фиг. 1).

Знание характерной архитектуры РНК-Cas белкового комплекса систем IIС типа позволило предсказать направление транскрипции CRISPR кассеты: пре-крРНК транскрибируется в противоположном от Cas генов направлении (фиг. 1).

Таким образом, анализ последовательности локуса PpCas9 позволил предсказать последовательности трейсерной и направляющих РНК (табл. 1).

Таблица 1
Определенные биоинформатическими методами последовательности направляющих РНК системы CRISPR PpCas9.
Жирным шрифтом обозначена последовательность прямого повтора DR

Название	Последовательность
PpCas9 трРНК	5' GCGAAATGAAAAACGUUGUUACAUAAGAGAUGAAUUUCUCGCAAAG CTCUGCCUCUUGAAAUUUCGGUUUCAAGAGGCAUCUUUUU-3'
PpCas9 крРНК	5'-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx GUUGUAGCUCCCUUUUUCAUUUCGC -3'

Для проверки активности PpCas9 нуклеазы и определения требуемого PpCas9 PAM мотива, были проведены эксперименты по воссозданию реакции разрезания ДНК *in vitro*. Для определения PAM последовательности белка PpCas9 использовали *in vitro* разрезание двунитевых PAM библиотек. Для этого необходимо было получить все компоненты эффекторного комплекса PpCas9: направляющие РНК и нуклеазу в рекомбинантной форме. Определение последовательности направляющих РНК позволило синтезировать *in vitro* молекулы crRNA и tracrRNA. Синтез осуществляли с помощью набора NEB Hi Scribe T7 RNA synthesis. Двунитевые ДНК библиотеки представляли собой фрагменты размером 374 пар нуклеотидов (п.н.), содержащие последовательность протоспейсера, фланкированную рандомизированными семью нуклеотидами (5'-NNNNNNN-3') с 3'- конца:

5'-

cccggggtaccacggagagatggtgaaatcatcttctctgtgggcatccttgatggccacctcgtcggaaagtcccacgaggatga
cagcaatgccaatgctggggggctctctgagaacgagctctgctgcctgacacggccaggacggccaacaccaaccagaactt
gggagaacagcactccgctctgggcttcatctcaactcgtcactccttgcaaacacaagaagagcattgtaaaataggatcta
catcacgtaacctgtctagaagaggctagatactgcaattcaaggaccttatctccttctcattgagcacNNNNNNNaactccatcta
ccagcctactctctatctctgtatt -3'

Для разрезания этой мишени использовали направляющие РНК следующей последовательности:
tracrRNA:

5'GCGAAATGAAAAACGUUGUUACAUAAGAGAUGAAUUUCUCGCAAAGCTCUGCC
UCUUGAAAUUUCGGUUUCAAGAGGCAUCUUUUU

и crRNA:

5' **uaucuccuuucauugagcac**GUUGUAGCUCCCUUUUUCAUUUCGC.

Жирным шрифтом выделена последовательность crRNA, комплементарная протоспейсеру (целевой ДНК последовательности).

Для получения рекомбинантного белка PpCas9 его ген был клонирован в плазмиду pET21a. В качестве кодирующей ген ДНК, использовалась ДНК, синтезированная в компании Integrated DNA Technologies. Последовательность была кодон-оптимизирована для исключения редких кодонов, встречающихся в геноме *P. pneumotropica*. Клетки *E. coli* Rosetta были трансформированы полученной плазмидой pET21 a-6xHis-PpCas9.

500 мкл ночной культуры разводили в 500 мл среды LB и растили клетки при температуре 37°C до

Предсказанная значимость пятой и шестой позиций была подтверждена экспериментально путем однонуклеотидных замен (пурин на пиримидин, и наоборот) в каждой из позиций PAM. При заменах в пятой и шестой позициях белок практически переставал работать. При замене в седьмой позиции эффективность работы PpCas9 снижалась в два раза, что отражает сниженные требования к нуклеотиду в этой позиции (фиг. 6). Таким образом, согласно полученным результатам *in vitro* PAM скрининга нуклеазы PpCas9 в пятой позиции PAM наиболее вероятными нуклеотидами являются аденин или гуанин, что удалось подтвердить экспериментально (фиг. 7). Замена А на Г никак не снижала эффективность разрезания фрагмента.

Согласно результатам *in vitro* скрининга фрагменты с "Т" либо с "С" в седьмой позиции должны распознаваться более эффективно. Для окончательной проверки значимости нуклеотидов в этой позиции были проведены дополнительные эксперименты. Результаты проведенных *in vitro* тестов показали, что при замене нуклеотида 'Т' в седьмой позиции на А или Г эффективность разрезания снижается на 40-50% (фиг. 8). Таким образом, седьмая позиция PAM является менее консервативной в сравнении с пятой и шестой: пурины в седьмом положении лишь снижают эффективность узнавания, но не препятствуют белку PpCas9 вносить двунитевые разрывы в ДНК.

В результате проведенных исследований удалось сделать следующий вывод: PAM, распознаваемый нуклеазой PpCas9, соответствует следующей формуле: 5'-NNNN(A/G)T-3'. Последовательности NNNNRTY (NNNN(A/G)-T-(T/C)) распознаются более эффективно, чем последовательности NNNNRTR (NNNN-(A/G)-T-(A/G)).

Нижеследующие примеры осуществления способа приведены в целях раскрытия характеристик настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Тестирование активности белка PpCas9 в разрезании различных ДНК мишеней.

Для того чтобы проверить способность PpCas9 узнавать различные последовательности ДНК, фланкированные 5'-NNNN(A/G)T-3' последовательностью, были проведены эксперименты по *in vitro* разрезанию ДНК-мишеней из последовательности гена *grin2b* человека (см. табл. 2).

Таблица 2

ДНК-мишени гена *grin2b* человека

последовательность	PAM						
TATCTCCTTTCAATGAGCAC	C	A	A	A	C	C	C
CAGCTGAAGTAATGTTAGAG	C	C	A	C	A	T	T
AATAAGAAAAACATTATTAT	C	A	C	C	A	T	T
GGGGCTATAAGTACACAAGC	G	C	T	G	C	A	T
CGTTGTCAGAAGAGCCCCC	C	A	G	C	A	T	T
CCCACGAGAAAGATGATTC	C	A	C	C	A	T	C

В реакции разрезания в качестве мишени использовался ПЦР фрагмент гена *grin2b*, несущий сайты узнавания (табл. 2), предположительно распознаваемые PpCas9 в соответствии с PAM консенсусом 5'-NNNN(A/G)T-3'. Для узнавания этих последовательностей были синтезированы кРНК, направляющие PpCas9 на данные сайты.

Реакции разрезания проводились в подобранных для PpCas9 условиях, результат представлен на фиг. 9. Из фиг. 9 видно, что фермент PpCas9 успешно порезал три из четырех мишеней с подходящим PAM.

Мишень на шестой дорожке имела PAM последовательность CAGCATT, которая согласно предсказаниям на основании результатов "depletion analysis" должна эффективно распознаваться белком. Однако в данном эксперименте узнавание данного фрагмента не произошло.

Поэтому была произведена дополнительная проверка PAM CAGCATT на другой мишени-протоспейсере, ограниченной таким же PAM (фиг. 10). В этом случае PAM эффективно распознавался, что приводило к порезке ДНК. Таким образом, белок имеет некие дополнительные предпочтения к последовательности ДНК мишени, возможно связанные со вторичной структурой ДНК.

Таким образом, проведенные исследовательские испытания показали наличие нуклеазной активности у PpCas9, а также позволили определить его PAM последовательность и верифицировать последовательности направляющих РНК.

PpCas9 рибонуклеопротеиновый комплекс специфически вносит разрывы в мишени, ограниченные PAM 5'-NNNN(A/G)T-3' с 5'-конца протоспейсера. Схема PpCas9-РНК комплекса представлена на фиг. 11.

Пример 2. Использование гибридной направляющей РНК для разрезания ДНК мишени.

sgRNA - форма направляющих РНК, которая представляет собой слитые воедино *tracrRNA* (трейсерная РНК) и *crRNA*. Для подбора оптимальной sgRNA были сконструированы три варианта этой последовательности, отличающиеся длиной *tracrRNA* - *crRNA* дуплекса. РНК синтезировали *in vitro* и проводили с ними эксперименты по разрезанию ДНК-мишени (фиг. 12).

В качестве гибридных РНК были использованы следующие РНК последовательности:

1 - sgRNA1 25DR:
UAUCUCCUUUCAUUGAGCACGUUGUAGCUCUUUUUCAUUUCGCGAAAGCGAA
 AUGA
 AAAACGUUGUUACAUAAGAGAUGAAUUUCUCGCAAAGCTCTGCCUCUUGAAAUU
 UCGG
 UUUCAAGAGGCAUCUUUUU

2 - sgRNA2 36DR
UAUCUCCUUUCAUUGAGCACGUUGUAGCUCUUUUUUUCAUUUCGAGUGCUAU
 AAUG
 AAAAUUUAUAGCACUGCGAAAUGAAAAACGUUGUUACAUAAGAGAUGAAUUUCU
 CGCAA
 GCUCUGCCUCUUGAAAUUUCGGUUUCAAGAGGCAUCUUUUU

Жирным шрифтом обозначена 20-нуклеотидная последовательность, обеспечивающая спаривание с ДНК-мишенью (вариабельная часть sgRNA). Кроме того, в эксперименте делали контрольную пробу без РНК, а также положительный контроль - порезка мишени с помощью crRNA + trRNA.

В качестве ДНК мишени использовалась последовательность, содержащая сайт узнавания 5'tatctcctttcattgagcac3' с соответствующим консенсусу PAMCAACATT:

5'-

```

ccccgggtaccacggagagatggtggaatcatcttctctgtgggcatccttgatggccacctctcggaaagtccccacgagatga
cagcaatgccaatgctgggggggctctctgagaacgagctctgctgacctgacacggccaggacggccaacaccaaccagaactt
gggagaacagcactcctgctctgggcttcatctcaactctgactccctgcaaacacaagaagagcatgttaaataggatcta
catcacgtaacctgtcttagaagaggtagatactgcaattcaaggaccttatctcctttcattgagcacCAACATTcaactccat
ctaccagcctactcttctctgttatt - 3

```

Жирным шрифтом обозначен сайт узнавания, прописными буквами - PAM.

Реакцию проводили в следующих условиях:

концентрация ДНК последовательности, содержащей PAM (CAACATT), - 20 нМ;

концентрация белка - 400 нМ;

концентрация РНК -2 мкМ;

время инкубирования - 30 мин;

температура инкубирования - 37°C.

Подобранные sgRNA1 и sgRNA2 оказались так же эффективны, как и нативные последовательности tracrRNA и crRNA: разрезание произошло в более 80% ДНК-мишенях (фиг. 12).

Эти варианты гибридной РНК могут быть использованы для разрезания любой другой целевой ДНК при изменении последовательности, непосредственно спаривающейся с ДНК-мишенью.

Пример 3. Белки Cas9 из близкородственных организмов, относящихся к *P. pneumotropica*.

На сегодняшний день в *P. pneumotropica* не охарактеризовано ни одного фермента системы CRISPR-Cas9. Сравнимый по размерам белок Cas9 из *Staphylococcus aureus* идентичен PpCas9 на 28% (фиг. 13, степень идентичности была рассчитана по программе BLASTp, default parameters). Похожая степень идентичности существует и для других известных белков Cas9 (не показано).

Таким образом, белок PpCas9 существенно отличается по аминокислотной последовательности от других Cas9 белков, изученных на сегодняшний день.

Специалисту в области генетической инженерии очевидно, что полученный и охарактеризованный в данном описании вариант последовательности белка PpCas9 может быть изменен без изменения функции самого белка (например, направленным мутагенезом аминокислотных остатков, напрямую не влияющих на функциональную активность (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989), CSHPress, p. 15.3-15.108)). В частности, специалисту известно, что могут быть изменены неконсервативные аминокислотные остатки, не затрагивающие остатки, определяющие функциональность белка (определяющие его функцию или структуру). Примерами таких изменений могут служить замены неконсервативных аминокислотных остатков на гомологичные. Некоторые из участков, содержащих неконсервативные аминокислотные остатки, приведены на фиг. 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения возможно использование белка, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и имеет отличия по сравнению с SEQ ID NO: 1 только в неконсервативных аминокислотных остатках, для образования двунитевого разрыва в молекуле ДНК, расположенного непосредственно перед нуклеотидной последовательностью 5'-NNNN(A/G)T-3' в указанной молекуле ДНК. Гомологичные белки могут быть получены путем мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредуемого мутагенеза) соответствующих молекул нуклеиновых кислот с последующим тестированием кодируемого модифицированного белка Cas9 на сохранение его функций в соответствии с описанными здесь функциональными анализами.

Пример 4.

Описанная в настоящем изобретении система PpCas9 в комплексе с направляющими РНК может быть использована для изменения последовательности геномной ДНК многоклеточного организма, в том числе эукариотического. Для введения системы PpCas9 в комплексе с направляющими РНК в клетки этого организма (во все клетки или в часть клеток) могут быть применены различные подходы, известные

специалистам. Например, методы доставки CRISPR-Cas9 систем в клетки организмов раскрыты в источниках (Liu C. et al., Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J. Control Release*. 2017 Nov 28; 266:17-26; Lino C.A. et al., Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv*. 2018 Nov; 25(1):1234-1257) и в источниках, раскрытых внутри этих источников.

Для эффективной экспрессии нуклеазы PpCas9 в эукариотических клетках будет желательно провести оптимизацию кодонов для аминокислотной последовательности белка PpCas9 методами, известными специалистам (например, IDT codon optimization tool).

Для эффективной работы нуклеазы PpCas9 в эукариотических клетках необходимо обеспечить импорт этого белка внутрь ядра эукариотической клетки. Для этого можно использовать сигнал ядерной локализации из Т-антигена вируса SV40 (Lanford et al., *Cell*, 1986, 46:575-582), соединённый с последовательностью PpCas9 с помощью спейсерной последовательности, описанной в Shen B., et al. "Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting", *Cell Res*. 2013 May; 23(5):720-3, или без нее. Таким образом, полная аминокислотная последовательность нуклеазы, транспортируемой внутрь ядра эукариотической клетки, будет представлять собой следующую последовательность: MAPKKKRVGIVGVPAA-PpCas9-KRPAATKKAGQAKKKK (далее PpCas9 NLS). Для доставки белка с приведенной выше аминокислотной последовательностью могут быть использованы по меньшей мере два подхода.

Доставка в виде гена осуществляется путем создания плазмиды, несущей ген PpCas9 NLS под регулирующей промотора (например, CMV промотора) и последовательности, кодирующей направляющие РНК под регуляцией U6 промотора. В качестве ДНК-мишеней используются ДНК последовательности, фланкированные 5'-NNNN(G/A)T-3', например последовательности гена *grin2b* человека:

5'-CAGCTGAAGTAATGTTAGAG-3'

Таким образом, кассета для экспрессии sgРНК выглядит следующим образом:

```
gaggcctatttcccatgattccttcatttgcatacatagatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaa
cacaagatattagacaaaatacgtgacgtagaaagtaataattcttggtagtttgcagtttaaaattatgtttaaaatgg
actacatatgcttaccgtaactgaaagtattcgttcttggcttatatacttgggaaaggacgaacaccg
CAGCTGAAGTAATGTTAGAGGTTGTAGCTCCCTTTTTCATTTTCGCGAAAGCGGAAATG
AAAA
ACGTTGTACAATAAGAGATGAATTTCTCGCAAAGCTCTGCCTCTTCAAATTTTCGGTT
TCAA
GAGGCATCTTTT
```

Жирным шрифтом выделена последовательность U6 промотора, далее идет последовательность, необходимая для узнавания целевой ДНК, а далее идет последовательность, образующая структуру sgRNA.

Плазмидную ДНК очищают и трансфицируют в клетки человека HEK293 с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Клетки инкубируют в течение 72 ч, после чего из них выделяется геномная ДНК с помощью колонок для очистки геномной ДНК (Thermo Fisher Scientific). Целевой ДНК сайт анализируется с помощью секвенирования на платформе Illumina с целью определения числа вставок-делений в ДНК, происходящих в целевом сайте по причине направленного двуникового разрыва и последующей его репарации.

Для амплификации целевых фрагментов используют праймеры, фланкирующие предположительное место внесения разрыва.

После амплификации пробы готовятся по протоколу реагента Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) для подготовки образцов к высокопроизводительному секвенированию. Затем проводится секвенирование на платформе Illumina 300 cycles, прямое прочтение. Результаты секвенирования анализируются биоинформатическими методами. В качестве детекции разрезания принимается вставка или делеция нескольких нуклеотидов в целевой последовательности ДНК.

Доставка в виде рибонуклеинового комплекса осуществляется путем инкубации рекомбинантной формы PpCas9 NLS с направляющими РНК в CutSmart буфере (NEB). Рекомбинантный белок получают из бактериальных клеток-продуцентов, очищая его с помощью аффинной хроматографии (NiNTA, Qiagen) разделением по размеру (Superdex 200).

Белок смешивают с РНК в соотношении 1:2 (PpCas9 NLS:sgRNA), инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре, затем смесь трансфицируют в клетки.

Далее проводится анализ экстрагированной из них ДНК на предмет вставок-делений в целевом ДНК сайте (как описано выше).

Охарактеризованная в настоящем изобретении нуклеаза PpCas9 из бактерии *Pasieureila prseumotropsca* имеет ряд преимуществ относительно ранее охарактеризованных Cas9 белков.

PpCas9 обладает коротким, двухбуквенным, отличным от других известных Cas нуклеаз PAM мотивом, необходимым для функционирования системы. В изобретении было показано, что для функционирования PpCas9 достаточно присутствия короткого PAM мотива (RT), расположенного в 4 нуклеотидах от протоспейсера.

Известное на сегодняшний день большинство Cas нуклеаз, способных вносить двуниговые разрывы в ДНК, имеют сложные многобуквенные PAM последовательности, ограничивающие выбор последова-

тельностей, пригодных для разрезания. Среди изученных Cas нуклеаз, распознающих короткие PAM, только PpCas9 может распознавать последовательности, фланкированные RT мотивом.

Второе преимущество PpCas9 - малый размер белка (1055 а.о). На сегодняшний день это единственный изученный малоразмерный белок, обладающий двухбуквенной RT PAM последовательностью.

PpCas9 - новая, малоразмерная Cas нуклеаза, имеющая короткий, простой в использовании PAM, отличающийся от известных на сегодняшний день PAM последовательностей других нуклеаз. Белок PpCas9 разрезает с высокой эффективностью различные ДНК-мишени, в том числе и при 37°C и может стать основой нового инструмента геномного редактирования.

Несмотря на то что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные случаи приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

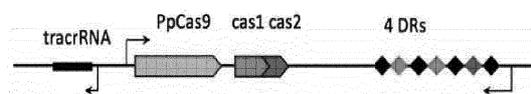
1. Применение белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и имеет отличия по сравнению с SEQ ID NO: 1 только в неконсервативных аминокислотных остатках, для образования двуникового разрыва в молекуле ДНК, расположенного непосредственно перед нуклеотидной последовательностью 5'-NNNN(A/G)T-3' в указанной молекуле ДНК.

2. Применение по п.1, характеризующееся тем, что образование двуникового разрыва в молекуле ДНК происходит при температуре от 35 до 45°C.

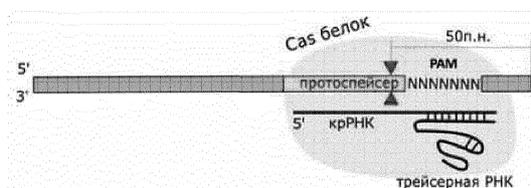
3. Применение белка по п.1, где белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

4. Способ изменения последовательности геномной ДНК одноклеточного или многоклеточного организма, включающий введение по меньшей мере в одну клетку этого организма эффективного количества а) либо белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, либо нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и б) либо направляющей РНК, содержащей последовательность, образующую дуплекс с нуклеотидной последовательностью участка геномной ДНК организма, непосредственно примыкающей к нуклеотидной последовательности 5'-NNNN(A/G)T-3', и взаимодействующей с указанным белком после образования дуплекса, либо последовательности ДНК, кодирующей указанную направляющую РНК; при этом взаимодействие указанного белка с направляющей РНК и нуклеотидной последовательностью 5'-NNNN(A/G)T-3' приводит к образованию двуникового разрыва в последовательности геномной ДНК, непосредственно примыкающей к последовательности 5'-NNNN(A/G)T-3'.

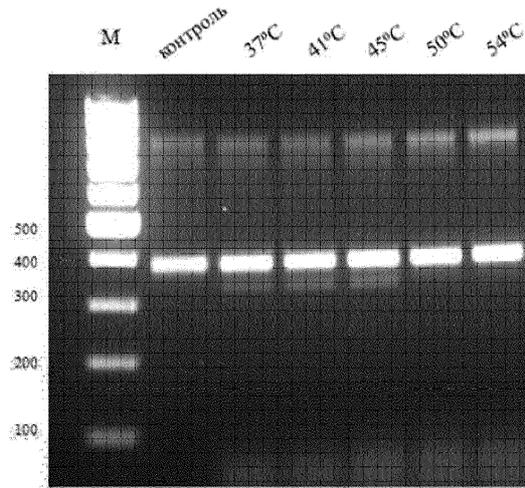
5. Способ по п.4, дополнительно включающий введение экзогенной последовательности ДНК одновременно с направляющей РНК.



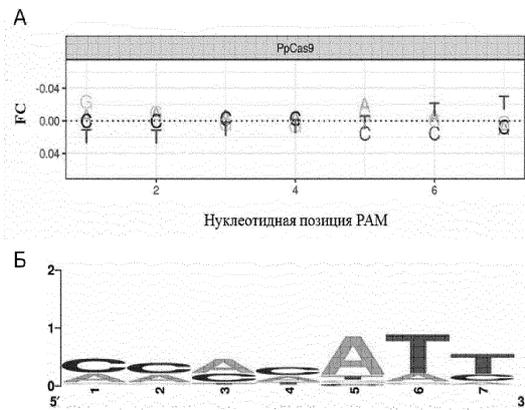
Фиг. 1



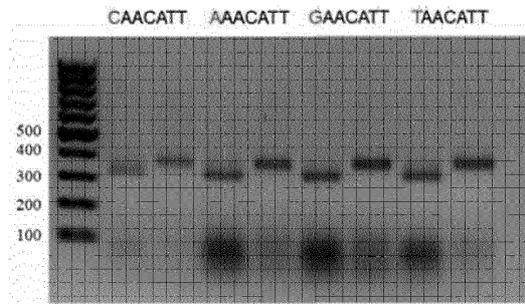
Фиг. 2



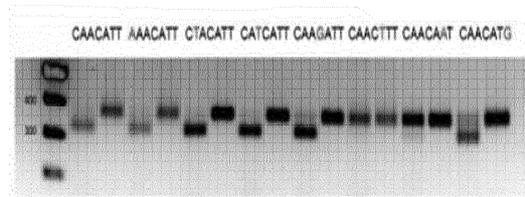
Фиг. 3



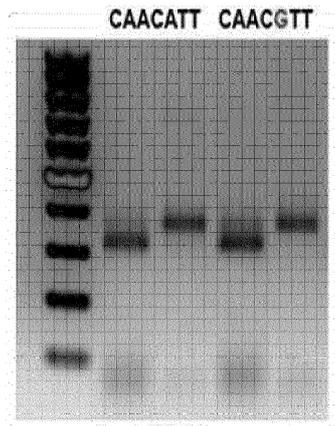
Фиг. 4



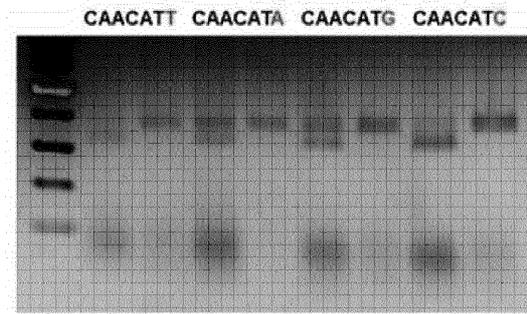
Фиг. 5



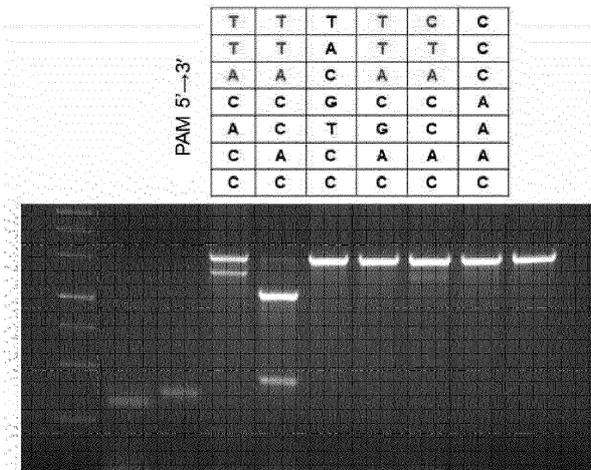
Фиг. 6



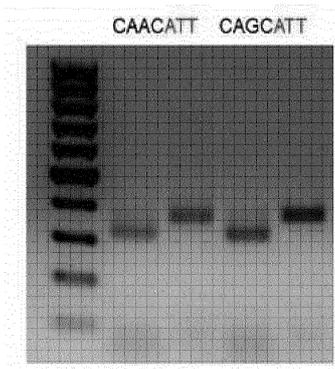
Фиг. 7



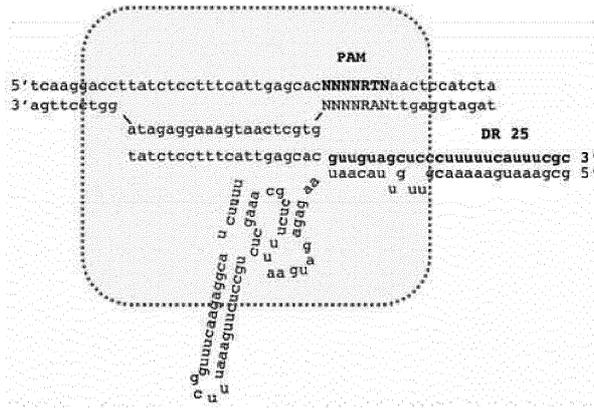
Фиг. 8



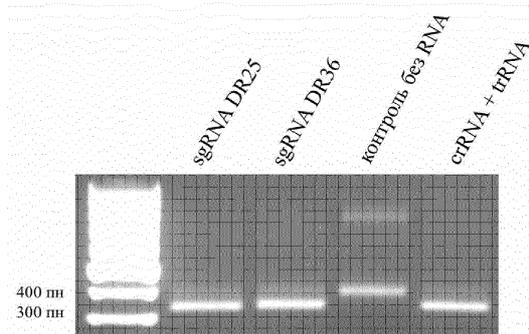
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

```

DyC19 1 QNNFL ██████████ L A I I VAYVEIDRESSPIRL ██████████ V I L R T A K T O E S L A L S ██████████ L A I S S ██████████ I K A I L L K K A
Sca19 1 R R ██████████ I L T V Y G I I D Y E T R D V A L I L R S I E N N E G S R K G A ██████████ R R A M I Q R V Y

DyC19 40 ██████████ I A E K I N S I D K L P V Y Q I ██████████ I I R Q V A V ██████████ V I L S O R E N E G K I N K E L O A L L S C A I I H O M
Sca19 40 ██████████ F D Y N I T D H S L S G P Y E A ██████████ S O S E E P S I A A A I V H N Y N E V E E I T O N E L S T R I Q S R S E A

DyC19 159 Q I S E Y T P I I A V K E P Q V E E M I I V O R V Y T H T S R I L L A M E I P O R A L G N Y T S T L L E N I A L L M W O K
Sca19 145 E F E Y V L Q L E R L K E D I V I N L A T S Y V R A K O L K V K A Y M Q D O P I D Y I D L L E A R T Y Y E G

DyC19 219 A L A G ██████████ D A I L K M I K P P I S Y K A A S I S I R P Y V T E ██████████ L E N G T R A N D N R A L L Q P Y E I V
Sca19 219 G I O S P F Q W D I K E W Y F M L I Y P I L R S V Y A S D L Y N A N D V Y T R D E N K R E Y I R Q I I N Y F K O A

DyC19 305 I V A V R A M L A L S D N A I P V Y L G E D K V E S I T L I P M P O C A T L O S A R L E K I N V I K G I S O I P O T A P S L
Sca19 294 P L K I A K I L V N E E D I V I V ██████████ I S T C P P F T N L I N D K O I T A R ██████████ E I I I A F Q A K I L T I

DyC19 414 K T D D C R Y E O K L P R V L N A L L E N L N P D K F I Q ██████████ L M Q P L M I Q G O R Y D E V S A I Y G D M Y G K S T E Y T R L L
Sca19 399 Q S S E Q E I T N S I L T Q E I E Q I S N L K O Y T O T H N ██████████ I N L D E L W M I N D N Q I I P N R L K L Y P I V D L S Q Q K E I

DyC19 495 I P A I I I N L I L I A R ██████████ V Y R L S A R M S I I V O R Y Q D R K L E K G L D K O R S A V K E P A M P N
Sca19 474 T L V D P I L S A S P I S I I I K K L N D I L I L K N K D A Q M I N F A R Q T N R I E I I R

DyC19 518 P V E P R G D L I A R Y E L Q A ██████████ G K S L E M R E K O Y V A L P R T M D ██████████ L A M O N I L V
Sca19 511 T I A E N A Y L F I R M D R E G ██████████ L E A I P E D S N P P N Y T I I V Y S P N ██████████ K O P S R A M P

DyC19 615 E V D O K N S E R W Q V Y V Q T S Q P S A K E Q I L H K L D R G I I N S Y A I K I F I A D N M L I Q
Sca19 590 Q Y S S D S K I S Y E T A K H I L N A K O G I S K T K K I L L E E D I P S V Q D N S A I G A I L L R S Y P R S

DyC19 644 K O K E N F A S Q I A L M R D L O N R Q N D R L V Y S C S Y A M Q Q I T R P Y R Y N G N V S O B R I D R E T G I
Sca19 644 N L D V K A S I Q P S P A R R F A I R G O Y K E L I I N A D P I P K I W S L D E A K E V S N O M E R K Q A E S M P E

DyC19 761 P L N P S P W A P P K E N V E I R S I N P K I E L E N R L P O N V N V O P L P S R M T K M T O G Q H M I V K A K R L N I L S V L K
Sca19 744 T E Q E Y K R I T P H Q I E N I K D P K I S I R D K R N E L I N D L Y T R K D D I L T L I V

DyC19 846 V P T O T K L S I E B M V R D R E I A I E S A R L P N D P A K A F A P P Y E K Q A V A V
Sca19 803 N N G T D R A N R K K L I A S P E L L M Y H D P O T O K L I K I D K N P L Y K Y E E T N V I T S K K D N O P Y I K E I

DyC19 857 R L E Q T O K S G V L V R G I O A D N A S M V I P T E G K P L P I Y T W G A Q I L P N R A A T O G K D N D W I M D E M
Sca19 841 K Y T G R K N A M L D I T D Y P N S R V Y K L S L K P Y P T L D N V A P T V K N L G I K E N Y E V S K C Y E A K K I K I S I N Q

DyC19 961 T T Q P I C Q ██████████ L V T K K T I P V F G I A T S I N I K H D L D K S G K K L O I Y L E V O V K L A I L E Q V U I K
Sca19 941 L I I A P Y N ██████████ I N G E L Y R V I N D I L I E V M I D I T R V L E N W N D R P P P I K T I A S K T O I K S T I I K

DyC19 1041 I R P C B P T I Q H V R
Sca19 1030 L Y E V E S L H P Q I I K K O
    
```

Фиг. 13

