

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043898**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.03

(21) Номер заявки
202190676

(22) Дата подачи заявки
2019.09.13

(51) Int. Cl. **C12N 9/22 (2006.01)**
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)

(54) **НУКЛЕАЗА PaCas9**

(31) **2018132816**

(32) **2018.09.14**

(33) **RU**

(43) **2021.06.08**

(86) **PCT/RU2019/050154**

(87) **WO 2020/055293 2020.03.19**

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

(72) Изобретатель:
**Мадера Дмитрий Александрович,
Карабельский Александр
Владимирович, Иванов Роман
Алексеевич, Морозов Дмитрий
Валентинович, Северинов
Константин Викторович, Шмаков
Сергей Анатольевич, Сутормин
Дмитрий Александрович, Побегалов
Георгий Евгеньевич, Васильева
Александра Андреевна, Селькова
Полина Анатольевна, Арсениев
Анатолий Николаевич, Зюбко
Татьяна Игоревна, Федорова Яна
Витальевна (RU)**

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

(56) **WO-A1-2017048969**
RU-C1-2634395
RU-C2-2650819

(57) 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.

B1

043898

043898

B1

Область техники

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: 17091712, 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 геномной 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 геномной 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 нук-

леиновую 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.

Amp^R - 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 последовательность 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-A сигнала тимидинкиназы для повышения стабильности мРНК,

F1 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 изобретении, 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 изобретении, 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 изобретении.

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 фиг. 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 вариабельной 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 транс-

крипцию 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 изобретении 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 изобретении как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы").

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

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 экспрессионный вектор, 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, YAC, 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 5168062, 4510245 и 4968615. 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 селективируемого маркера. Ген селективируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4399216, 4634665 и 5179017). Например, обычно ген селективируемого маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую вектор введен. Например, гены селективируемого 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 изобретении 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 изобретении.

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, 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455. 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, яска, 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 изобретении, 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 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 данное изобретение 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 нуклеаза 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-А 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 варибельной 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.

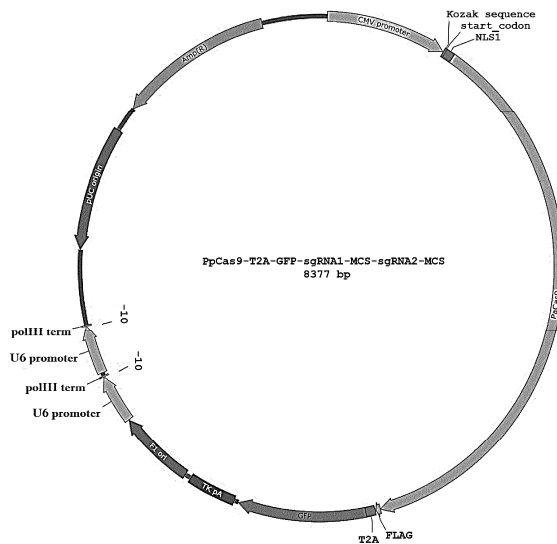
После выявления PAM последовательности, проводится оценка активности нуклеазы in vitro. Для этого белок в комплексе с направляющими РНК инкубируется с ДНК-фрагментом, несущим последовательность протоспейсера и выявленный PAM. Определено оптимальное соотношение РНК-белкового комплекса к разрезаемой ДНК. 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 двухцепочечный 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, содержащую следующие элементы:
 ген бета-лактамазы,
 промотор ранних генов цитомегаловируса,
 последовательность Kozak,
 старт-кодон,
 сигналы ядерной локализации,
 нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, кодирующую нуклеазу PaCas9 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2,
 последовательность эпитопа FLAG,
 нуклеотидную последовательность модифицированного зелёного флуоресцентного белка,
 последовательность поли-А сигнала тимидинкиназы,
 ориджин репликации,
 кассеты для экспрессии малых молекул РНК, каждая кассета содержит U6 промотор и терминатор транскрипции РНК полимеразы III и рUC ориджин репликации в бактериях.
5. Способ доставки в клетки-мишени или ткани-мишени терапевтического агента, который включает введение вектора по любому из пп.3, 4 в клетки-мишени или ткани-мишени.
6. Способ получения клетки-хозяина для получения нуклеазы PaCas9 по п.1, включающий трансформирование клетки вектором по любому из пп.3, 4.
7. Клетка-хозяин для получения нуклеазы PaCas9 по п.1, содержащая нуклеиновую кислоту по п.2.
8. Способ получения нуклеазы PaCas9 по п.1, заключающийся в культивировании клетки-хозяина по п.7 в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанной нуклеазы PaCas9, с последующим выделением и очисткой полученной нуклеазы PaCas9.



Фиг. 1

PaCas9 1 MAKTRLGIDMGFNSIGWMLYELDKNGEISEVLKAGVRIFPDGREDKTQASKNAARRVARM
 RuvCII
 PaCas9 61 NRRQRDRYLQRRRTAILRYLVKFGMLPEDKTEQRKIQDIDPYSIRAKAMEEIEIPPHLGRA
 PaCas9 121 IFHISQRRGYKSSRRNEENDKDGPKVKSIEEFRRQLGDKSVGQFLSELHQENKPIRARD
 PaCas9 181 GVTNNDLFHYFPDRELIKEKFNDIWQKQQIRSQQPKNKQILSDILTNEKQTLFEVIF
 Rec lobe
 PaCas9 241 HQRSLKPPPIIGNCQFFPTKKRIAKALPSQRFRIILQDINNLEYFDENEWHPLPSSIRDWA
 PaCas9 301 LHILFAGNLTFFKILNSQMKDGEINESAFNLEDEKRNDIKGDFTTKMKELIIPALWDN
 PaCas9 361 WDLHKQDSMILLIIGDKSIEDKMLDEKMLDELSSHYNLSEEAQECANANIDNRQGVV
 PaCas9 421 GRASLSLEAISILIPYLEKGNHYDKALAESGIEKDKSSKHDDHFYMQPYPEILGQWCLPR
 RuvCII
 PaCas9 481 KSEDESNNKELWRIPNPTVHVALNQLRAVVNDCIRINGEKPSQVVVELARDLPIGIATRQ
 PaCas9 541 EIRKKQSENQRARTQRNKIEELGERASAKSMLRMQLWEESPKNANHCCLYCGKQIGC
 HNH
 PaCas9 601 AAAVSSPDPEIDHILPFSKTLDDSAANKTLCCVQCNRKGNKTPYEAWGSNEKRYDEIKT
 PaCas9 661 RASALSPKRRRFLPDAMKHFDDNDFLARQLDTQYIAKVKRYFESIIKPNVYVIFG
 RuvCIII
 PaCas9 721 RLTEILRRKWLNNILNDDGHKNRDDRHHAVDAVIGATTRSTLQKFATEAGKDNSDLP
 PaCas9 781 NVSITAPMKVFREKVEKTVKNIVVSHKPDFESGALHNDTAYGLPADYKEGAGAQFVRRH
 PaCas9 841 IMLSDITTFNSQKVVNSFLREELKTLCDYATDKKSLDQELKRYGEKNNIRRVLIIEKLSV
 PaCas9 901 IAVCDKDGKPKYKYSDSNWAYEIFEKFPNGNWDGEEISTFNANQEKFTPLWKEKNPKAK
 PaCas9 961 LIMRLHKNDMVALDDNGLRKICYVKTLSASKIAMVEHFDATPGRNPPTIITKSPNEFRKI
 PaCas9 1021 NGRKIHISPGGLVRDTPKDKGRSNH

Фиг. 2

