

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241065**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **434484**

(22) Data zgłoszenia: **26.06.2020**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12N 9/10 (2006.01)

(54) **Zastosowanie fuzyjnej polimerazy DNA Bst-Nec do izotermalnego powielania specyficznych sekwencji wirusa SARS CoV-2**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

27.12.2021 BUP 39/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

01.08.2022 WUP 31/22

(73) Uprawniony z patentu:

**GENEME SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Gdańsk, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARTA SKWARECKA, Grodztwo, PL
KASJAN SZEMIAKO, Gdańsk, PL
DAWID NIDZWORSKI, Gdańsk, PL
SABINA ŻOŁĘDOWSKA, Gdańsk, PL
MARCIN OLSZEWSKI, Gdańsk, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Małgorzata Matyka

PL 241065 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie fuzyjnej polimerazy DNA Bst-Nec do izotermalnego powielania specyficznych sekwencji wirusa SARS CoV-2 w celu wykrywania RNA wirusa w badanej próbce. Jest również możliwe bezpośrednie wykrywanie wirusa z wymazu bez konieczności izolacji RNA.

Polimerazy DNA to enzymy, które odgrywają zasadniczą rolę w procesie replikacji i naprawie DNA. Znalazły one szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach nauki, z powodzeniem stosowane są w sekwencjonowaniu czy różnych wariantach reakcji PCR (ang. Polymerase Chain Reaction), gdzie katalizują proces syntezy DNA *in vitro*, który przebiega cyklicznie w ściśle określonych etapach termicznych. Innym podejściem i coraz popularniejszym w ostatnich czasach jest wykorzystanie polimeraz DNA w technikach izotermicznych do amplifikacji DNA, które nie opierają się na termocyklu, a reakcja prowadzona jest w stałej temperaturze wydłużania. Do tej pory opracowano wiele takich technik służących powielaniu zarówno DNA jak i RNA. Dobór odpowiedniej polimerazy do danej techniki uzależniony jest głównie od jej właściwości. Oprócz podstawowej właściwości polimeryzacyjnej mogą one posiadać zdolności do hydrolizy cząsteczek DNA dzięki obecności domeny egzonukleolitycznej czy aktywność odwrotnej transkryptazy. Cechy te determinowane są obecnością w ich budowie odpowiednich domen. Podstawowe domeny jakie występują u tych enzymów to domena polimeryzacyjna oraz 3'-5' i 5'-3' egzonukleolityczna. Znane są polimerazy, u których delekcja domeny egzonukleolitycznej prowadzi do uzyskania funkcjonalnego białka o częściowo zmienionych cechach w stosunku do enzymu natywnego. Wśród takich polimeraz najpopularniejsza jest polimeraza *Taq* wyizolowana z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus*, której odkrycie całkowicie odmieniło oblicze biologii molekularnej. Pozbawiona aktywności 5'-3' egzonukleazy polimeraza *Taq* Δ 289 charakteryzuje się zwiększoną termostabilnością, jednakże wymaga też zwiększonego zapotrzebowania na jony Mg^{2+} , a nowopowstała nić DNA obdarzona jest mniejszą liczbą błędów. Polimerazą, stosowaną w technikach izotermicznej amplifikacji DNA jest polimeraza *Bst*, której forma natywna posiadająca nieaktywną domenę 3'-5' egzonukleolityczną oraz aktywną 5'-3' egzonukleolityczną, której aktywność może zostać wyłączona za pomocą punktowej mutacji w pozycji 73 (Tyr⁷³→Phe⁷³ and Tyr⁷³→Ala⁷³). Polimeraza ta podobnie jak polimeraza *Taq* należy do rodziny A, a wyizolowano ją z bakterii *Bacillus stearothermophilus*. Optymalną aktywność osiąga w temperaturze ok. 60°C, a pozbawiona aktywności egzonukleazy posiada zdolność zastępowania nici (strand displacement activity), która jest niezwykle przydatna w reakcji LAMP – Loop Mediated Isothermal Amplification. Polimeraza wykazuje zwiększoną tolerancję na inhibitory kliniczne czy środowiskowe w porównaniu z innymi polimerazami z tej rodziny, jednak nadal, biorąc pod uwagę aplikacje tej polimerazy, istotne jest poszukiwanie rozwiązań prowadzących do poprawy głównie jej procesywności i odporności na inhibitory.

Białko NeqSSB należy do rodziny białek SSB (ang. Single-Stranded DNA Binding protein). Białka SSB wykazują różnorodność sekwencji aminokwasowych oraz struktury. Mimo to wszystkie posiadają charakterystyczną, silnie zakonserwowaną, ok. 100 – aminokwasową domenę oligonukleotydomię OB (ang. Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding Fold Domain). Występuje ona powszechnie u białek posiadających zdolności wiązania ssDNA, determinuje, więc tą podstawową i wspólną dla wszystkich białek SSB cechę – niespecyficzne wiązanie jednoniciowej nici DNA, a także, odkryte znacznie później, wiązanie RNA. Białka SSB odgrywają zasadniczą rolę w procesach ściśle związanych z ssDNA. Odgrywają istotną rolę w replikacji, rekombinacji i naprawie DNA. Odpowiadają za interakcje z jednoniciowym DNA, zapobiegają tworzeniu struktur drugorzędowych i chronią przed degradacyjnym działaniem nukleaz.

Odkrycie białek SSB datuje się na połowę lat 60-tych XX wieku. Pierwsze wykryte białka to białko SSB faga T4 oraz *E. coli*. Odkryto wtedy ich silne właściwości związane z oddziaływaniem z ssDNA oraz elucję białka w złożu ssDNA-celuloza w obecności wysokiego stężenia soli – 2 M NaCl. Zwrócono również uwagę na bardzo wysoką selektywność tego białka do jednoniciowego DNA. Potwierdzeniem fundamentalnej roli białek SSB w procesach związanych z ssDNA jest fakt, iż występują one u wszystkich organizmów żywych, a także u wirusów.

Wiązanie się białka SSB z ssDNA polega na upakowaniu aromatycznych reszt aminokwasowych między zasady w łańcuchu oligonukleotydomię. Ponadto dodatkowo naładowane reszt aminokwasowych oddziałują ze szkieletem fosforanowym w cząsteczce ssDNA.

Mimo przynależności białka NeqSSB do rodziny białek SSB odbiega ono swoimi cechami od klasycznych białek SSB, stąd określane jest jako białko NeqSSB-podobne. Białko to pochodzi

z hipertermofilnego archeona *Nanoarchaeum equitans*, który pasożytuje w craenarchaeonie *Ignicoccus hospitalis*. Optymalne warunki wzrostu tego mikroorganizmu wymagają ściśle beztlenowych warunków i temperatury 90°C. Co ciekawe *Nanoarchaeum equitans* posiada najmniejszy znany genom składający się z 490,885 par zasad. W przeciwieństwie do większości znanych organizmów o obniżonych genomach, posiada pełny zestaw enzymów biorących udział w replikacji, naprawie i rekombinacji DNA, w tym białko SSB.

W przedmiotowym wynalazku została użyta polimeraza, która została zmodyfikowana poprzez dołączenie do natywnego enzymu białka NeqSSB. Białko to należy do rodziny białek SSB (ang. Single-Stranded DNA Binding protein).

Białka SSB wykazują różnorodność sekwencji aminokwasowych oraz struktury. Mimo to wszystkie posiadają charakterystyczną, silnie zakonserwowaną, ok. 100 – aminokwasową domenę oligonukleotydową OB (ang. Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding Fold Domain).

Występuje ona powszechnie u białek posiadających zdolności wiązania ssDNA, determinuje, więc tą podstawową i wspólną dla wszystkich białek SSB cechę – niespecyficzne wiązanie jednoniciowej nici DNA. Białka SSB odgrywają zasadniczą rolę w procesach ściśle związanych z ssDNA takich jak replikacja, rekombinacja i naprawa DNA. Odpowiadająca interakcje z jednoniciowym DNA, zapobiegają tworzeniu struktur drugorzędowych i chronią przed degradacyjnym działaniem nukleaz. Mimo przynależności białka NeqSSB do rodziny białek SSB odbiega ono swoimi cechami od klasycznych białek SSB, stąd określane jest jako białko NeqSSB-podobne. Białko to pochodzi z hipertermofilnego archeona *Nanoarchaeum equitans*, który pasożytuje w craenarchaeonie *Ignicoccus hospitalis*. Optymalne warunki wzrostu tego mikroorganizmu wymagają ściśle beztlenowych warunków i temperatury 90°C. *Nanoarchaeum equitans* posiada najmniejszy znany genom składający się z 490,885 par zasad. W przeciwieństwie do większości znanych organizmów o obniżonych genomach, posiada pełny zestaw enzymów biorących udział w replikacji, naprawie i rekombinacji DNA, w tym białko SSB. Badania wskazują na nietypowe dla innych białek SSB zdolności wiązania wszystkich form DNA (ssDNA, dsDNA) oraz mRNA bez strukturalnych preferencji. Ponadto białko charakteryzuje się wysoką termostabilnością. Czas półtrwania przy zachowaniu aktywności biologicznej wynosi 5 min w 100°C, natomiast temperatura topnienia to 100,2°C. Fuzyjna polimeraza DNA NeqSSB-Bst otrzymana została poprzez połączenie polimerazy Bst z białkiem NeqSSB na N-końcu polimerazy za pomocą 6-aminokwasowego linkera o sekwencji aminokwasowej: Gly-Ser-Gly-Gly-Val-Asp. Analiza porównawcza właściwości enzymu poddanemu ochronie patentowej z referencyjną polimerazą DNA Bst dostępną komercyjnie wykazała, że obecność dodatkowego białka wiążącego DNA ma pozytywny wpływ na cechy polimerazy DNA. Charakteryzuje się ona podwyższoną termostabilnością, zwiększoną procesywnością, a także zwiększeniem tolerancji na inhibitory takie jak heparyna, laktoferyna, czy kwas humusowy. Innowacyjna, fuzyjna polimeraza DNA wykazuje również zwiększoną czułość i specyficzność reakcji co ma kluczowe znaczenie w diagnostyce molekularnej.

Celem niniejszego wynalazku jest zastosowanie fuzyjnej polimerazy DNA *Bst-Nec* do wykrywania wirusa bez konieczności izolacji RNA.

Przedmiotem wynalazku jest fuzyjna polimeraza DNA *Bst-Nec* do zastosowania do izotermalnego powielania specyficznych sekwencji wirusa SARS CoV-2. Fuzyjna polimeraza wykrywa RNA wirusa z próbki materiału biologicznego bez izolacji RNA.

Określenia stosowane powyżej oraz w opisie i zastrzeżeniach patentowych, mają następujące znaczenie:

materiał biologiczny – oznacza próbkę materiału uzyskaną w postaci wymazu z nosa, nosogardzieli.

Opis figur i tabel:

Fig. 1 – przedstawia Rozcieńczenia RNA wirusa SARS-CoV-2 wykrywane w postaci krzywych – LOD proponowanego rozwiązania.

Fig. 2 – przedstawia brak odpowiedzi proponowanego wynalazku na RNA innych koronawirusów oraz odpowiedź na RNA SARS-CoV-2 – specyficzność względem SARS-CoV-2.

Fig. 3 – przedstawia analizę próbek klinicznych za pomocą proponowanego rozwiązania.

Tabela 1 – przedstawia seryjne rozcieńczenia RNA wirusa SARS-CoV-2 które zostały wykorzystane do oceny LOD. Odpowiedzi proponowanego wynalazku przedstawiono na figurze 1.

Tabela 2 – przedstawia zestawienie tabelaryczne analizowanych RNA innych koronawirusów oraz SARS-CoV-2 do oceny specyficzności.

Tabela 3 – przedstawia zestawienie tabelaryczne analizowanych próbek klinicznych proponowanym rozwiązaniem.

Tabela 4 – przedstawia porównanie tabelaryczne wyników uzyskanych za pomocą proponowanego rozwiązania w porównaniu do „złotego standardu” metody RT-PCR.

Wynalazek ilustruje następujący przykład wykonania, niestanowiący jego ograniczenia

a)

Polimeraza, została zmodyfikowana poprzez dołączenie do natywnego enzymu białka NeqSSB. Białko to należy do rodziny białek SSB (ang. Single-Stranded DNA Binding protein).

Dzięki temu możliwe jest również przeprowadzenie reakcji bezpośrednio na próbce wymazu nosogardzieli lub gardła bez konieczności oczyszczania RNA.

Przeprowadzono badania potwierdzające skuteczność wykorzystania polimerazy Bst-Nec w diagnostyce wirusa SARS CoV2:

Wyznaczenie LOD – limit of detection

Wykonano seryjne 10-krotne rozcieńczenia RNA wirusa i wyznaczono minimalną ilość kopii RNA wirusa, która jest możliwa do wykrycia.

Otrzymane wyniki wskazują na uzyskiwanie pozytywnych wyników reakcji dla 10 kopii wirusa w badanej próbce (fig. 1; tab. 1).

b)

Wykonano również test specyficzności reakcji. Wyznaczając specyficzność testu przeprowadzono reakcję na 4 różnych wirusach z rodziny koronawirusów: HCoV-NL63, HCoV-283E, HCoV-OC43, HCoV-229E. Miano badanych wirusów znacznie przekroczyło stężenie fizjologiczne i wynosiło ok. 1×10^7 PFU. Jako kontroli pozytywnej użyto RNA wirusa SARS-CoV-2 o PFU ok. 1×10^4 . Reakcję prowadzono 30 min.

Otrzymane wyniki wskazują na wysoką specyficzność reakcji z wykorzystaniem polimerazy Bst-Nec (fig. 2; tab. 2)

c)

Przeprowadzono również reakcję z wykorzystaniem próbek klinicznych. Reakcję przeprowadzono bez izolacji RNA bezpośrednio wykorzystując medium transportowe jako matrycę do reakcji.

Badanie wykazało 100% zbieżności wyników testu izotermalnej amplifikacji ze złotym standardem reakcją PCR. Ponadto wyniki otrzymane proponowaną metodą izotermalną wymagają krótszego czasu analizy niż metoda rekomendowana przez WHO (fig. 3; tab. 3–4).

d)

Reakcja przeprowadzana była w objętości 20 μ l. Zastosowano następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 10x Isothermal Buffer [200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 1% Tween 20], 10 mM dNTPs, 100 mM MgSO_4 , Startery: 1,6 μ M FIP/BIP, 0,2 μ M F3/B3, 0,4 μ M LoopF/B, NeqSSB-GssFull polymerase 0,32 U/ul reakcji, RT 1 U/ul reakcji, Inhibitor RNaz 0,4 U/ul reakcji.

Do reakcji zastosowano następujące startery oligonukleotydowe:

F3 5'-CCACT AGAGGAGCTACTGTA-3'

B3 5'-TGACAAGCTCAACACGT-3'

FIP 5'-AGGTGAGGGTTTTCTACATCACTATATTGGAACAAGCAAATTCTATGG-3'

BIP 5'-ATGGGTTGGGATTATCCTAAATGTGTGCGAGCAAGAACAAGTG-3'

LF 5'-CAGTTTTTAACATGTTGTGCCAACCC-3'

LB 5'-TAGAGCCATGCCTAA CATGCT-3'

Zastrzeżenia patentowe

1. Fuzyjna polimeraza DNA Bst-Nec do zastosowania do izotermalnego powielania specyficznych sekwencji wirusa SARS CoV-2.
2. Fuzyjna polimeraza według zastrz. 1, **znamienna tym**, że wykrywa RNA wirusa z próbki materiału biologicznego bez izolacji RNA.

Rysunki

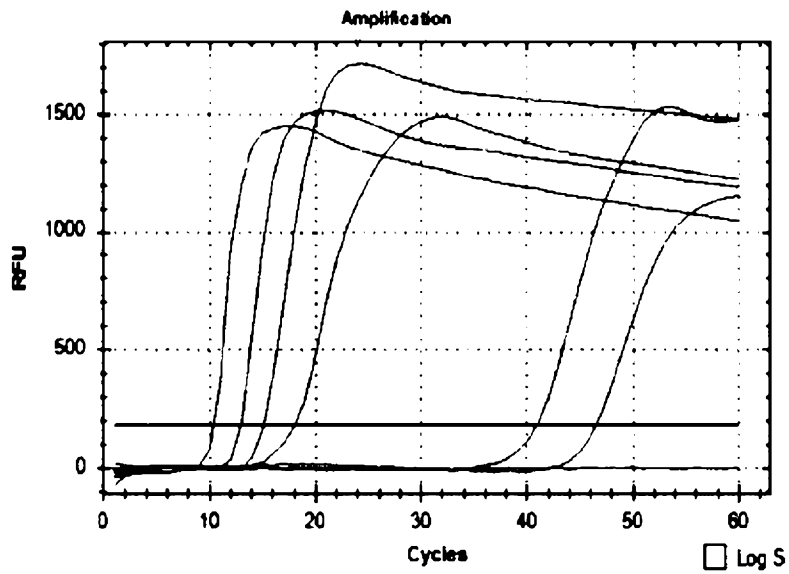


Fig.1

Sample	Cq
RNA 0.1 ng	10.33
RNA 0.01 ng	12.90
RNA 0.001 ng	15.06
RNA 0.0001 ng	18.01
RNA 0.00001 ng	40.81
RNA 10 ⁻⁶ ng	46.44
	N/A

Tab.1

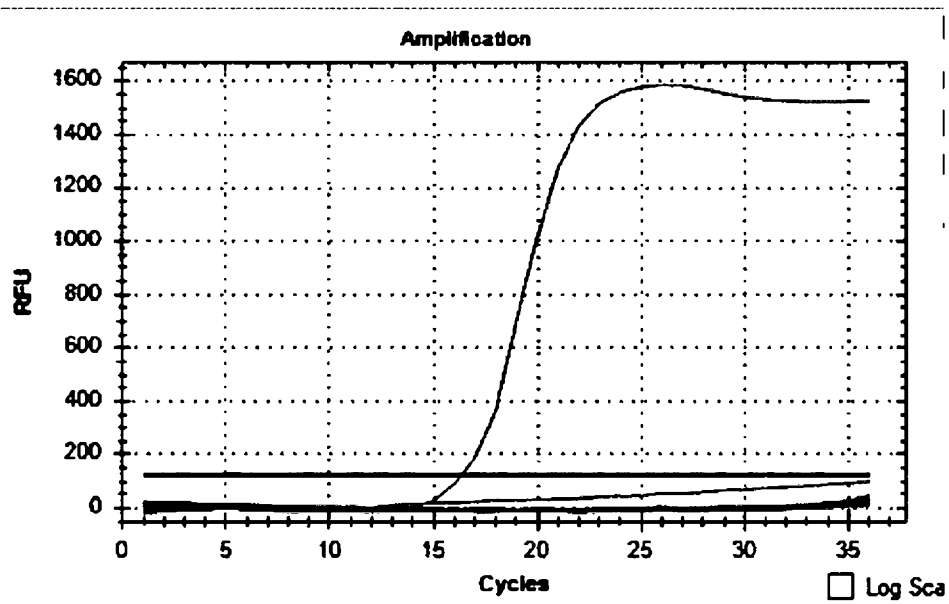


Fig.2

Sample	Cq
K-	N/A
SARS-CoV-2	16.32
HCoV-NL63	N/A
HCoV-283E	N/A
HCoV-OC43	N/A
HCoV-223E	N/A
HCoV-229E	N/A

Tab.2

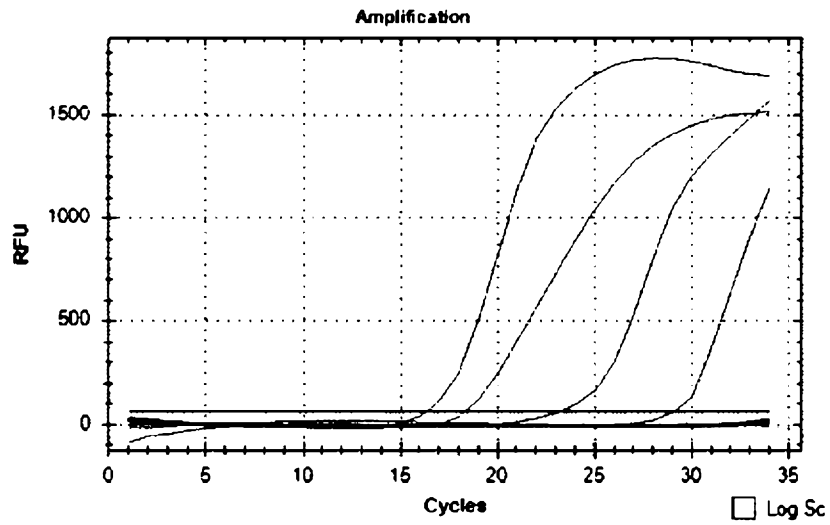


Fig.3

Content Δ	Sample \diamond	Cq \diamond
Neg Ctrl	K-	N/A
Pos Ctrl	RNA SARS-CoV-2	16.24
Unkn	1738	N/A
Unkn	1657	N/A
Unkn	1739	N/A
Unkn	1735	N/A
Unkn	1729	18.25
Unkn	1515	28.97
Unkn	1733	23.08

Tab.3

Nr próbki	Izotermalna (Ct=czas w minutach)	RT qPCR (Ct/czas w minutach)	Zgodność pomiędzy metodami
1738	N/A	N/A	zgodny
1657	N/A	N/A	zgodny
1739	N/A	N/A	zgodny
1735	N/A	N/A	zgodny
1729	18,3	27,4/33,5	zgodny
1515	28,9	25,9/32,5	zgodny
1733	23,1	23,4/30,5	zgodny

Tab.4