

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2019143431, 01.11.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
01.11.2012 US 61/721,302;  
14.03.2013 US 61/785,404;  
03.07.2013 US 61/842,874(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2015120524 29.05.2015

(43) Дата публикации заявки: 28.04.2020 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"(71) Заявитель(и):  
ФЭКТОР БАЙОСАЙЕНС ИНК. (US)(72) Автор(ы):  
ЭНДЖЕЛ, Матью (US),  
РОДЕ, Кристофер (US)

## (54) СПОСОБЫ И ПРОДУКТЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ

## (57) Формула изобретения

1. Композиция для создания одноцепочечного или двухцепочечного разрыва в последовательности молекулы ДНК-мишени, не являющейся клеткой человека, при этом композиция содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-редактирующий белок, при этом ген-редактирующий белок содержит

(a) ДНК-связывающий домен, при этом

ДНК-связывающий домен содержит множество последовательностей повторов, где по меньшей мере одна из последовательностей повторов имеет 36 аминокислот в длину и содержит аминокислотную последовательность LTPvQVVAIAwxyzGHGG, где

“v” является Q, D или E,

“w” является S или N,

“x” является N, H или I,

“y” является D, A, I, N, H, K, S или G, и “z” представляет собой,

GGKQALETVQRLLPVLCQD или GGKQALETVQRLLPVLCQA, и

(b) домен нуклеазы, при этом домен нуклеазы содержит каталитический домен нуклеазы.

2. Композиция по п. 1, где домен нуклеазы способен образовывать димер с доменом нуклеазы другого белка.

3. Композиция по п. 1, где домен нуклеазы содержит каталитический домен FokI или StsI.

4. Композиция по п. 3, где StsI выбирают из StsI, StsI-HA, StsI-HA2, StsI-UHA, StsI-UHA2, StsI-HF и StsI-UHF или его биологически активного фрагмента.

A  
2019143431  
RUR U  
2019143431  
A

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где композиция способна снижать экспрессию одного или более пептидов, кодируемых молекулой ДНК-мишени.

6. Композиция по любому из пп. 1-5, где композиция способна образовывать ген, который кодирует нефункциональный белок.

7. Композиция по любому из пп. 1-6, где композиция способна образовывать ген, который кодирует доминантно-негативный белок.

8. Композиция по любому из пп. 1-7, где композиция способна вызывать пропуск экзона.

9. Композиция по любому из пп. 1-7, где домен нуклеазы содержит каталитический домен белка, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 53.

10. Композиция по любому из пп. 1-9, где нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность внутриядерной локализации.

11. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что последовательность внутриядерной локализации содержит аминокислотную последовательность PKKKRKV.

12. Композиция по любому из пп. 1-9, где нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность внутримитохондриальной локализации.

13. Композиция по п. 12, где последовательность внутримитохондриальной локализации содержит аминокислотную последовательность LGRVIPRKIASRASLM.

14. Композиция по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что ДНК-связывающий домен и домен нуклеазы разделены линкером.

15. Композиция по п. 14, где линкер имеет длину в пределах между приблизительно 1 и приблизительно 10 аминокислотами.

16. Композиция по любому из пп. 1-15, где нуклеиновая кислота содержит синтетическую молекулу РНК.

17. Композиция по любому из пп. 1-16, где нуклеиновая кислота содержит один или более неканонических нуклеотидов.

18. Композиция по п. 17, где неканонические нуклеотиды выбирают из 5-метилуридина, 5-гидроксиуридина, псевдоуридина, 5-метил псевдоуридина, 5-гидроксипсевдоуридина, 5-метилцитидина и 5-гидроксцитидина.

19. Композиция по любому из пп. 1-18, где ген-редактирующий белок дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность повтора, содержащую аминокислотную последовательность: LTP<sub>v</sub>QVVAIAwxyzGHGG, где "v" представляет собой E, "w" представляет собой S, "x" представляет собой N, "y" представляет собой I или S, и "z" представляет собой GGKQALETVQRLLPVLCQA.

20. Композиция по любому из пп. 1-18, где ген-редактирующий белок дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность повтора, содержащую аминокислотную последовательность: LTP<sub>v</sub>QVVAIAwxyzGHGG, где "v" представляет собой E, "w" представляет собой S, "x" представляет собой N, "y" представляет собой I, и "z" представляет собой GGKQALETVQRLLPVLCQA.

21. Композиция по любому из пп. 1-18, где ген-редактирующий белок дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность повтора, содержащую аминокислотную последовательность: LTP<sub>v</sub>QVVAIAwIyzGHGG, где "v" представляет собой E, "w" представляет собой S, "y" представляет собой I или A, и "z" представляет собой GGKQALETVQRLLPVLCQA.

22. Композиция по любому из пп. 1-18, где ген-редактирующий белок дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность повтора, содержащую аминокислотную последовательность: LTP<sub>v</sub>QVVAIAwxyzGHGG, где "v" представляет собой Q, D или E, "w" представляет собой S или N, "x" представляет собой N, "y" означает

I или S, и "z" представляет собой GGKQALETVQRLLPVLCQD или GGKQALETVQRLLPVLCQA.

23. Композиция по любому из пп. 1-18, где ген-редактирующий белок дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность повтора, содержащую аминокислотную последовательность: LTPvQVVAIAwxyzGHGG, где "v" представляет собой Q, D или E, "w" представляет собой S или N, "x" представляет собой N, "y" выбирают из: D, A, H, N, K или G, и "z" представляет собой GGKQALETVQRLLPVLCQD или GGKQALETVQRLLPVLCQA.

24. Композиция по любому из пп. 1-18, где ген-редактирующий белок дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность повтора, содержащую аминокислотную последовательность: LTPvQVVAIAwxyzGHGG, где "v" представляет собой Q, D или E, "w" представляет собой S или N, "x" представляет собой H, "y" выбирают из: D, A, H, N, K или G, и "z" представляет собой GGKQALETVQRLLPVLCQD или GGKQALETVQRLLPVLCQA.

25. Композиция по любому из пп. 1-23, где множество последовательностей повторов содержит между около 1,5 повторов последовательностей и около 28,5 последовательностей повторов.

26. Композиция по любому из пп. 1-24, где число последовательностей повторов составляет около 11,5, около 14,5, около 17,5 или примерно 20.

27. Композиция по любому из пп. 1-26, где число последовательностей повторов является достаточным, чтобы обеспечить высокую специфичность распознавания сайта связывания на молекуле ДНК-мишени.

28. Способ *in vitro* изменения последовательности молекулы ДНК-мишени в соматической клетке и/или в клетке, не являющейся клеткой человека, включающий контактирование композиции по любому из пп. 1-27 с соматической клеткой, клеткой и/или клеткой, не являющейся клеткой человека.

29. Способ по п. 25, где одноцепочный или двухцепочный разрыв создаются в последовательности молекулы ДНК-мишени в соматической клетке, клетке и/или клетке, не являющейся клеткой человека.

30. Композиция по любому из пп. 1-29, где одноцепочный или двухцепочный разрыв приводят к инактивации гена, образованию неактивного белка, белка со сниженной активностью или доминантно-негативной формы белка, репарируют мутации в гене или обеспечивают пропуск экзона.

31. Способ по п. 28 или 29, где соматическая клетка и/или клетка, не являющаяся клеткой человека, представляет собой клетку млекопитающего.

32. Способ по любому из пп. 28-31, где соматическая клетка представляет собой клетку человека.

33. Способ по любому из пп. 28-31, где соматическая клетка и/или клетка, не являющаяся клеткой человека, дополнительно контактируют с нуклеиновой кислотой, кодирующей ген человека или его фрагмент.

34. Способ по п. 33, где ген человека или его фрагмент вставлен в геном соматической клетки и/или клетки, не являющейся клеткой человека.

35. Способ по любому из пп. 28-34, где клетка представляет собой соматическую клетку человека, ген-редактирующий белок нацелен на один или более генов человека, или где, когда клетка является клеткой, не являющейся клеткой человека, ген-редактирующий белок нацелен на один или более эндогенных ортологов гена человека.

36. Способ по п. 35, где один или более эндогенных ортологов инактивированы.

37. Способ по любому из пп. 25-36, где соматическая клетка и/или клетка, не являющаяся клеткой человека, дополнительно дифференцируется в клетку кожи, глюкозочувствительную инсулин-продуцирующую клетку, гемопоэтическую клетку,

клетку сердечной мышцы, клетку сетчатки, клетку почки, нервную клетку, стромальную клетку, жировую клетку, костную клетку или мышечную клетку.

38. Способ по любому из пп. 25-37, где соматическую клетку и/или клетку, не являющуюся клеткой человека, культивируют в формате, совместимом с высокопроизводительным скринингом.

39. Способ по п. 38, где данный формат представляет собой многолуночный планшет.

40. Способ по любому из пп. 25-35, дополнительно включающий стадию имплантации соматической клетки и/или клетки, не являющейся клеткой человека, в бластоцисту или матку организма, не являющегося человеком.

41. Способ по п. 40, где организм, не являющийся человеком, выбирают из крысы, мыши, кролика, морской свинки, примата, свиньи, коровы, курицы, козы, осла, кошки, собаки и данио-рерио.

42. Набор для изменения последовательности молекулы ДНК-мишени в соматической клетке и/или в клетке, не являющейся клеткой человека, содержащий композицию по любому из пп. 1-27.

43. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую ген-редактирующий белок, охарактеризованный в любом из пп. 1-27 для изменения последовательности молекулы ДНК-мишени в соматической клетке и/или клетке, не являющейся клеткой человека.

44. Вектор по п. 43, где данный вектор представляет собой вирусный вектор.

45. Вектор по п. 44, где вирусный вектор включает один или более вирусов из: аденоовириуса, ретровириуса, лентивириуса, вируса герпеса, адено-ассоцииированного вируса и сконструированного вируса.