



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/00 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020110861, 16.03.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.03.2020

Дата регистрации:
11.11.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.03.2020

(45) Опубликовано: 11.11.2020 Бюл. № 32

Адрес для переписки:

119991, Москва, Ломоносовский пр-т, 2, стр. 1,
ФГАУ "НМИЦ здоровья детей" Минздрава
России, патентоведу Наливайко Е.В.

(72) Автор(ы):

Шамина Ольга Вячеславовна (RU),
Маянский Николай Андреевич (RU),
Лазарева Анна Валерьевна (RU),
Крыжановская Ольга Андреевна (RU),
Алябьева Наталья Михайловна (RU),
Бржозовская Екатерина Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
учреждение "Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ФГАУ "НМИЦ здоровья детей"
Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2524143 C2, 27.04.2014. YULIYA
BOCHAROVA и др. Inactivation of the oprD
porin gene by a novel insertion sequence ISPa195
associated with large deletion in a carbapenem-
resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolate,
Journal of Global antimicrobial resistance, 17
(2019), p 309-311. Glob Antimicrob Resist 2019
06 23;17:309-311. Epub 2019 Jan (см. прод.)

(54) Фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность с инвертированными повторами МТЕКpnl у колистин-резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Путем секвенирования была получена нуклеотидная последовательность МТЕКpnl. Для выделения ДНК использовали суточную культуру штамма *K. pneumoniae*, резистентного к колистину, полученную при посеве на агар Uri-select (BioRad, США). Экстракцию ДНК из бактериальных культур выполняли с помощью коммерческого набора реагентов DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Установлена и описана нуклеотидная последовательность фрагмента

ДНК, нарушающая структуру и функцию гена mgrB у колистин-резистентного штамма *K. pneumoniae*. Использование описанной нуклеотидной последовательности МТЕКpnl:3 GGAAGGTGCGAATAAGTCAACCAACGCAAAA AAAACGCSTATGTAAAGTGATTGAATTTAATT GACTAAAAGTTTTCATTTTTCTGTTGCGG AGGGTACTTATTCGCACCTTCC-5', способной к интеграции и перемещениям внутри генома, а также способной изменять структуру, функцию и экспрессию гена, ее обнаружение в бактериальном геноме поможет расшифровать механизмы возникновения резистентности

бактерий к антибиотикам, что будет способствовать рациональному выбору антимикробных препаратов и разработке мер по преодолению устойчивости. 2 ил.

(56) (продолжение):

23., найдено в Интернет 24.09.2020, адрес сайта: <https://www.pubfacts.com/detail/30684654/Inactivation-of-the-oprD-porin-gene-by-a-novel-insertion-sequence-ISPa195-associated-with-large-dele>.

R U 2 7 3 6 1 1 4 C 1

R U 2 7 3 6 1 1 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 736 114** ⁽¹³⁾ **C1**(51) Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(52) CPC
C12N 15/00 (2020.08)(21)(22) Application: **2020110861, 16.03.2020**(24) Effective date for property rights:
16.03.2020Registration date:
11.11.2020

Priority:

(22) Date of filing: **16.03.2020**(45) Date of publication: **11.11.2020 Bull. № 32**

Mail address:

**119991, Moskva, Lomonosovskij pr-t, 2, str. 1,
FGAU "NMITS zdorovya detej" Minzdrava Rossii,
patentovedu Nalivajko E.V.**

(72) Inventor(s):

**Shamina Olga Vyacheslavovna (RU),
Mayanskij Nikolaj Andreevich (RU),
Lazareva Anna Valerevna (RU),
Kryzhanovskaya Olga Andreevna (RU),
Alyabeva Natalya Mikhajlovna (RU),
Brzhozovskaya Ekaterina Anatolevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr zdorovya detej"
Ministerstva zdavookhraneniya Rossijskoj
Federatsii (FGAU "NMITS zdorovya detej"
Minzdrava Rossii) (RU)**(54) **DNA FRAGMENT COMPRISING NUCLEOTIDE SEQUENCE WITH INVERTED MITEKPNL REPEATS
IN COLISTIN-RESISTANT STRAINS OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Nucleotide sequence MITEK_{nn} was obtained by sequencing. DNA culture used is a culture of the colistin-resistant *K. pneumoniae* strain obtained by Uri-select agar culturing (BioRad, USA). DNA extraction from bacterial cultures is carried out using a commercial set of DNeasy Blood & Tissue Kit reagents (Qiagen, Germany) in accordance with manufacturer's instructions. Nucleotide sequence of the DNA fragment which breaks the structure and function of the *mgrB* gene in a colistin-resistant strain of *K. pneumoniae* is described and described.

EFFECT: use of described nucleotide sequence M YTEK_{pnl}:3GGAAGGTGCGAATAAGTCACCAAA CGCAAA AAAACGCCTATGTAAGTGATTGAAT TTAATT GACTAAAAGTTTCATTTTCGTTGCGG AGGGTACTTATTCGCACCTTCC-5', capable of integration and movement within the genome, as well as capable of changing the structure, function and expression of the gene, its detection in the bacterial genome will help to decipher mechanisms of bacterial resistance to antibiotics, which will facilitate rational selection of antimicrobial preparations and development of measures to overcome resistance.

1 cl, 2 dwg

RU 2 736 114 C1

RU 2 736 114 C1

Изобретение относится к микробиологии, молекулярной биологии и может быть использовано в клинической микробиологии для расшифровки механизмов возникновения резистентности бактерий к антибиотикам.

Проблемы возникновения, распространения и эволюции резистентности микробов к антибиотикам находятся в центре внимания клинической микробиологии. Это связано с тем, что на фоне замедления разработки новых антимикробных препаратов наблюдается повсеместный рост резистентности к ним и появление панрезистентных штаммов микробов. С начала 1990-х гг. наблюдается значительная тенденция к росту числа инфекций, связанных с грамотрицательными возбудителями, которые обладают фенотипом множественной лекарственной устойчивости. Грамотрицательные патогены, такие как *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, обладают свойством приобретать устойчивость к антимикробным препаратам. Развитие и совершенствование молекулярно-генетических технологий внесло существенный вклад в формирование базы знаний, касающихся механизмов устойчивости к антибиотикам, их эволюции и распространения. Актуальные данные о частоте возникновения устойчивости, молекулярных механизмах возникновения резистентности конкретного вида возбудителя инфекционного процесса, лежат в основе эффективности антибактериальной терапии. Описаны различные механизмы, опосредующие устойчивость к антибиотикам: модификация мишени действия, инактивация антибиотика, активное выведение антибиотика из микробной клетки - эффлюкс, нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки, формирование метаболического "шунта". Большую роль в распространении генетических детерминант антибиотикорезистентности, повреждении генов, кодирующих структуры бактериальной клетки, играют мобильные генетические элементы. Известен фрагмент ДНК, обнаруженный у *Pseudomonas aeruginosa*, содержащий нуклеотидную последовательность ISPa195, инактивирующий ген порина OprD, что приводит к резистентности к карбапенемным антибиотикам (Y Vocharova, 2019, doi: 10.1016/j.jgar.2019.01.016).

Известен фрагмент ДНК, обнаруженный у *Acinetobacter baumannii*, содержащий нуклеотидную последовательность ISAba10, внедренный в ген bla_{OXA-23}, что приводит к резистентности к карбапенемным антибиотикам (Y Lee, 2011, doi: 10.1128/AAC.01672-09).

Известен фрагмент ДНК, обнаруженный у *A. baumannii*, содержащий нуклеотидную последовательность ISAba11, внедренный в гены lpxA и lpxC, что приводит к резистентности к колистину, поскольку у бактерий наблюдается полная утрата липополисахарида клеточной стенки (JH Moffatt, 2011, doi: 10.1128/AAC.01732-10).

Известны три фрагмента ДНК, обнаруженные у *Burkholderia glumae*, содержащие нуклеотидные последовательности IS1417, IS1418, и IS1419, способные активировать экспрессию неогена вектора-ловушки pSH11063 (A Hasebe, 2000, doi: 10.1128/AAC.01672-09).

Известен рекомбинантный полипептид с активностью цефалоспориноацетилгидролазы, имеющий аминокислотную последовательность общей формулы [NY]_n, где n 4 или 8; Y аминокислотная последовательность с мол.м. примерно 35 кД, кодируемый геном цефалоспориноацетилгидролазы, происходящим от *Bacillus subtilis* SHS 0133 (Ferm BP-2755). При получении полипептида, обладающего активностью цефалоспорингидролазы, ведут культивирование клеток *Escherichia coli*, трансформированных рекомбинантной молекулой ДНК, содержащей ДНК-фрагмент, полученный из генома *B. subtilis* SHS 0133, продуцирующий указанный полипептид (Патент РФ №2103364).

Известен Фрагмент ДНК, который кодирует промотор, обеспечивающий регулируемую кальцием экспрессию полипептидов, в частности ферментов в клетках *Streptomyces* (Патент РФ №2112802).

Известна рекомбинантная плазмидная ДНК pMind-varC, представляющую собой плазмиду pMind, в которую клонирована последовательность. Рекомбинантная плазмидная ДНК pMind-varC позволяет осуществлять гиперэкспрессию токсина VarC в штаммах *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium tuberculosis* (Патент РФ №2524143), выбранный нами в качестве прототипа.

Задачей изобретения является фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность с инвертированными повторами MITEKpnl у колистин-резистентных штаммов *K. pneumoniae*, которая может быть использована в качестве референсной при поиске мутаций в генах бактерий и расшифровать механизмы возникновения резистентности бактерий к антибиотикам.

Технический результат, на достижение которого направлена данная нуклеотидная последовательность MYYEKpnl, заключается в ее способности к интеграции и перемещениям внутри генома, а так же способности изменять структуру, функцию и экспрессию генов, в результате чего ее обнаружение в бактериальном геноме поможет расшифровать механизмы возникновения резистентности бактерий к антибиотикам.

Сущность изобретения заключается в создании нуклеотидной последовательности с инвертированными повторами MYYEKpnl у колистин-резистентных штаммов *K. pneumoniae*, которая может быть использована в качестве референсной при поиске мутаций в генах бактерий и расшифровать механизмы возникновения резистентности бактерий к антибиотикам. С помощью секвенирования была получена нуклеотидная последовательность MITEKpnl. Для выделения ДНК использовали суточную культуру штамма *K. pneumoniae*, резистентного к колистину, полученную при посеве на агар Uri-select (BioRad, США). Экстракцию ДНК из бактериальных культур выполняли с помощью коммерческого набора реагентов DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Для выявления и секвенирования mgrV гена использовались праймеры, предложение 62. Ген mgrV выявляли с помощью полимеразной-цепной реакции (ПЦР). Результаты ПЦР реакции оценивали путем проведения горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле. Подготовка матриц для секвенирования включала амплификацию гена mgrV. Очистку ПЦР-продуктов от избытка праймеров, димеров праймеров и дНТФ проводили ферментативным разрушением с помощью экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы (SAP, Affymetrix, США) при температуре 37°C в течение 30 мин. с последующей инактивацией при 85°C. Секвенирование проводили методом Сенгера с использованием наборов реагентов «BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Thermo Fisher Scientific) и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) по методике, описанной производителем. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности гена mgrV обрабатывали с помощью программы SeqMan.

Нуклеотидная последовательность MITEKpnl приведена на Фиг. 1.

Нуклеотидная последовательность нового вставочного элемента MITEKpnl, встроенного в mgrV ген, была внесена в международную базу данных GenBank под номером MK241841 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MK241841.2/>). Нуклеотидная последовательность MITEKpnl внесена в международную базу данных «IS-finder» под номером CP018364 (<https://www-is.biotoul.fr/scripts/ficheIS.php?name=MITEKpnl>).

Внесенная последовательность стала референсной для поиска аналогичных вставочных элементов и выявления нарушений структуры генов. Рекомбинантная

плазмидная ДНК pMind - varC, обеспечивающая гиперэкспрессию гена varC в клетках *M. tuberculosis*, представляющая собой плазмиду pMind, в которую клонирована нуклеотидная последовательность. Установлена и описана нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, нарушающая структуру и функцию гена mgrB у колистин-резистентного штамма *K. pneumoniae*. Данный фрагмент ДНК относится к группе миниатюрных мобильных элементов с инвертированными повторами (Miniature Inverted Repeat Transposable Element, MITE), которому было присвоено название MITEKpnI. MITE представляют собой последовательности ДНК, способные к интеграции и перемещениям внутри хозяйского генома, они играют важную роль в изменении структуры генома, функций и экспрессии генов. MITE обычно не имеют открытых рамок считывания, поэтому переносятся через транспозазы, закодированные автономными ДНК-транспозонами. Из-за того, что MITE имеет малый размер их передвижение в геноме до конца не изучено и имеются трудности в их идентификации и исследовании. Обнаруженный MITEKpnI состоит из 109 пар нуклеотидов (пн) принадлежит к семейству вставочных элементов IS5-family, не имеет открытых рамок считывания, содержит прямые повторы (direct repeat, DR) размером 4 пн (СТАА). Во время исследования, фрагмент ДНК, описанный как MITEKpnI, был обнаружен в гене mgrB, который кодирует маленький трансмембранный белок MgrB, негативный регулятор системы PhoPQ (Фиг. 2). При фосфорилировании регуляторного белка PhoP происходит транскрипция mgrB. Белок MgrB подавляет экспрессию гена, кодирующего PhoQ. Таким образом, происходит регуляция двухкомпонентной системы PhoPQ по типу отрицательной обратной связи. При инактивации mgrB происходит гиперактивация системы PhoPQ, что ведет к активации транскрипции pmgHFJKLM оперона и присоединению L-Ara4N к липополисахариду клеточной стенки грамотрицательных бактерий, что в конечном итоге приводит к развитию резистентности к антибиотикам группы полимиксинов (колистин). Группа полимиксинов, а именно колистин, вызывает значительный интерес в лечении заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, поскольку сохраняет активность в отношении данных возбудителей. Однако, в последнее время наблюдается быстрое распространение резистентности и к данному препарату. На сегодняшний день в литературе описаны молекулярные механизмы, лежащие в основе появления устойчивости к колистину, но обнаруженный MITEKpnI, который являлся причиной резистентности к колистину у исследованных штаммов, описан впервые. Поскольку такие вставочные элементы могут мигрировать в геноме, может встречаться сразу несколько их копий в разных генах, а также, поскольку вставочные элементы распространяются посредством горизонтального переноса между бактериями разных видов, понятно, что для поиска таких модификаций необходима референсная последовательность.

Использование описанной нуклеотидной последовательности, способной к интеграции и перемещениям внутри генома, а так же способной изменять структуру, функцию и экспрессию гена, ее обнаружение в бактериальном геноме поможет расшифровать механизмы возникновения резистентности бактерий к антибиотикам, что будет способствовать рациональному выбору антимикробных препаратов и разработке мер по преодолению устойчивости. Изобретение может быть использовано при анализе данных полногеномного секвенирования.

(57) Формула изобретения

Фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность 3'-

GGAAGGTGCGAATAAGTCACCCAAACGCAAAAAACGCCTATGTAAGTGATTGAATTTAA
TTGACTAAAAGTTTCATTTTCGTTGCGGAGGGTACTTATTCGCACCTTCC-5' с

инвертированными повторами MITEKpnI у колистин-резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, которая может быть использована в качестве референсной при поиске мутаций в генах бактерий и расшифровать механизмы возникновения резистентности бактерий к антибиотикам.

10

15

20

25

30

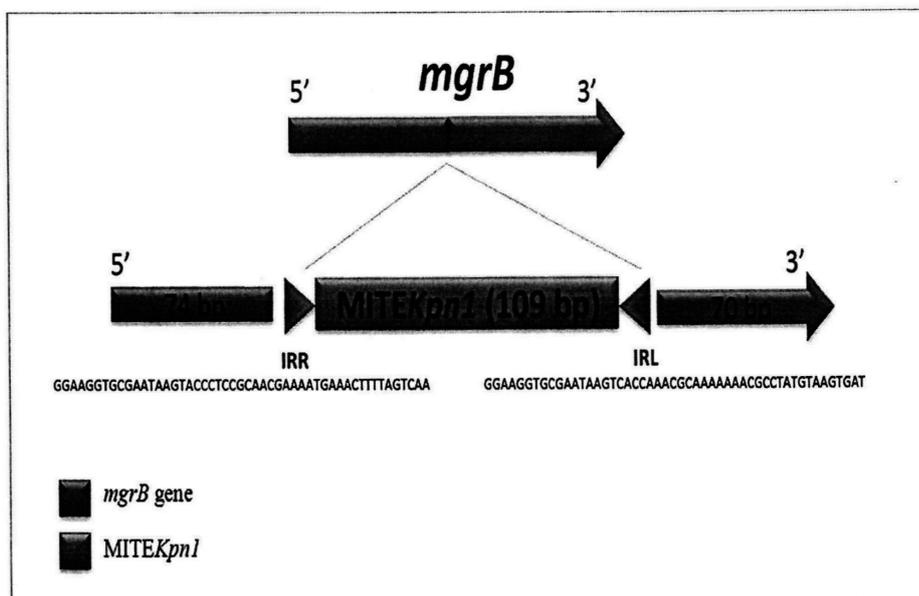
35

40

45

3'-GGAAGGTGCGAATAAGTCACCAAACGCAAAAAACGCCTATGTAAGTGAT
 TGAATTTAATTGACTAAAAAGTTTCATTTTCGTTGCGGAGGGTACTTATTCGCACCTTC
 C-5'

Фиг.1



Фиг.2