



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118328** (13) **C2**
(51) МПК**C07H 21/02** (2006.01)**C12P 21/06** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

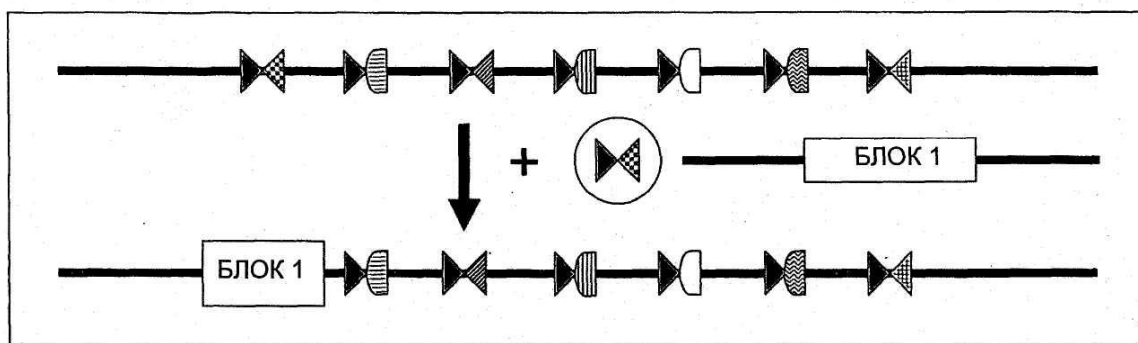
(21) Номер заявки: а 2012 10055	(72) Винахідник(и): Ейнлі Уїлльям М. (US), Мюррей Майкл Г. (US), Урнов Фьодор (US), Цайтлер Брайан (US)
(22) Дата подання заявки: 24.01.2011	(73) Власник(и): ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЛЛС, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268- 1054, United States of America (US), САНГАМО ТЕРАП'ЮТІКС, ІНК., Point Richmond Tech Center, 501 Canal Blvd., Suite A100, Richmond, CA 94804, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.01.2019	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/336,457	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Cai C. Q. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases / C. Q. Cai, Y. Doyon, W. M. Ainley et al // Plant Molecular Biology. – 2008 (27.12.2008). – Vol. 69. – No. 6. – P. 699 - 709 Shukla V. K. Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases / V. K. Shukla, Y. Doyon, J. C. Miller et al // Nature: International Weekly Journal of Science (and supplementary information). – Vol. 459. – No. 7245. – P. 437-441 Durai S Zinc finger nucleases: custom- designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells / S. Durai, M. Mani, K. Kandavelou, J. Wu et al // Nucleic Acids Research. – 2005. – Vol. 33. – No. 18. – P. 5978 - 5990 US 2006/188987 A1, 24.08.2006 US 2006/195937 A1, 31.08.2006 WO 2008/021207 A2, 21.02.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 22.01.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.09.2012, Бюл.№ 18	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2019, Бюл.№ 1	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2011/000125, 24.01.2011	

(54) СПОСІБ ІНТЕГРУВАННЯ ЕКЗОГЕННИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ГЕНОМ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ**(57) Реферат:**

Винахід стосується ізольованої рослинної клітини, яка містить ендогенний геном і екзогенну нуклеїнову кислоту, інтегровану в ендогенний геном. Екзогенна нуклеїнова кислота містить сайт множинної інсерції, причому зазначений сайт множинної інсерції містить три або більше різних парних сайтів-мішеней для однієї або декількох пар нуклеаз цинкового пальця. Винахід також стосується способу інтегрування однієї або більше екзогенних послідовностей у геном рослинної клітини.

UA 118328 C2

Фиг. 1



ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[0001] Дана заявка претендує на пріоритет Попередньої Заявки на патент США № 61/336457, поданої 22 січня 2010 року, розкриття якої включено в даний документ за допомогою посилання у всій її повноті.

5 ЗАЯВА ВІДНОСНО ПРАВ НА ВІНАХОДИ, ЗРОБЛЕНІ В РАМКАХ ФЕДЕРАЛЬНО ФІНАНСОВАНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ І РОЗВИТКУ РОЗРОБКИ

[0002] Не застосовне.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

10 [0003] Дане розкриття інформації належить до галузі геномної інженерії, зокрема, до цільової інтеграції і/або цільової ексцизії однієї або більше екзогенних послідовностей у геномі клітини.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[0004] Біотехнологія стала важливим інструментом у зусиллях для розв'язання проблеми збільшення світового попиту на виробництво продуктів харчування. Традиційні підходи до підвищення продуктивності в сільському господарстві, наприклад, збільшення врожаю або розроблена резистентність до шкідників, ґрунтуються або на мутаційній селекції, або на введенні нових генів у геноми видів сільськогосподарських культур шляхом трансформації. Обидва процеси є по своїй суті неспецифічними і відносно неефективними. Наприклад, традиційні способи трансформації рослин доставляють екзогенну ДНК, яка інтегрується в геном у випадкових місцях. Таким чином, з метою виявлення й ізоляції трансгенних ліній із заданими характерними властивостями, необхідно створити тисячі унікальних випадкових інтеграційних подій, а потім - екран для заданих індивідуумів. У результаті інженерія звичайних ознак рослин є трудомісткою, тривалою й непередбачуваною справою. Крім того, випадковий характер цих інтеграцій робить важким пророкування того, чи відбудуться плейотропні ефекти, пов'язані з неумисним порушенням геному. У результаті розмноження, ізоляція й характеристика ліній рослин з інженерними генами або ознаками були надзвичайно трудомісткими й дорогими процесами з низькою імовірністю успіху.

[0005] Цільова генна модифікація долає матеріально-технічні проблеми звичайної практики в рослинних системах, і, як таку, давно існуючу, але недосяжну ціль як у фундаментальних дослідженнях біології рослин, так і в сільськогосподарській біотехнології. Проте, за винятком "генної орієнтації" через позитивно-негативний вибір препарату в рисі або використання попередньо-інженерних сайтів рестрикції, цільова геномна модифікація всіх видів рослин, як моделі, так і сільськогосподарської культури, донедавна виявлялася дуже важкою. Terada et al. (2002) Nat Biotechnol 20(10):1030; Terada et al. (2007) Plant Physiol 144(2):846; D'Halluin et al. (2008) Plant Biotechnology J. 6(1):93.

[0006] У клітинах ссавців стабільний трансгеноз і цільова інсерція генів мають багато потенційних застосувань як у генній терапії, так і в клітинній інженерії. Однак, сучасні стратегії найчастіше є неефективними і вставляють трансген у геномну ДНК неспецифічним способом. Нездатність контролювати розташування геномної інсерції може призвести до дуже різних рівнів експресії трансгена серед популяції через ефекти положення в межах геному. Крім того, сучасні способи стабільного трансгенозу й ампліфікації трансгенів часто приводять до фізичної втрати трансгена, сайленсінгу трансгена із часом, інсерційному мутагенезу за рахунок інтеграції гена і автономного промотора всередині ендегенного гена або поряд із ним, створення хромосомних аномалій і експресії перебудованих генних продуктів (які складаються із ендегенних генів, вставлених трансгенів або того й іншого), і/або створення пов'язаних з векторами видами токсичності й імуногенності in vivo від отриманих з вектора генів, які експресуються постійно у зв'язку з необхідністю довгострокової персистенції вектора, щоб забезпечити стабільну експресію трансгена.

[0007] Нещодавно були описані способи і композиції для цільового розщеплення геномної ДНК. Такі події цільового розщеплення можуть бути використані, наприклад, для того, щоб індукувати цільовий мутагенез, індукувати цільові делеції послідовностей клітинної ДНК, а також - сприяти цільовій рекомбінації в предетермінованому хромосомному локусі. Див., наприклад, патентні публікації США під номерами 20030232410, 20050208489, 20050026157, 20050064474 і 20060188987, і Міжнародну публікацію WO 2007/014275, розкриття яких включено в даний документ за допомогою посилання у всій їх повноті для будь-яких цілей. Патентна публікація США № 20080182332 описує використання неканонічних нуклеаз цинкового пальця (нуклеази цинкового пальця (ZFN)) для цільової модифікації геномів рослин, а патентна публікація США № 20090205083 описує ZFN-опосередковану цільову модифікацію EPSPS локусу рослини. Крім того, роботи Moehle et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(9): 3055-3060) описують використання ZFN, призначених для додавання цільового гена в певному локусі.

[0008] Проте, залишається потреба в композиціях і способах цільової інтеграції, у тому числі для цільової інтеграції в рослини, для створення у рослині і її потомстві стабільних генетичних модифікацій, які успадковуються і для цільової інтеграції в клітинах ссавців для генної терапії і для цілей розвитку клітинних ліній.

5 СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

[0009] Дане розкриття належить до способів і композицій для експресування одного або більше продуктів екзогенної послідовності нуклеїнових кислот (тобто білка або молекули РНК), яка була інтегрована в сайт множинної інсерції, інтегрований у геном клітини. Клітина може являти собою еукаріотичну клітину, наприклад, клітину рослини, дріжджів або ссавців.

10 [0010] Інтеграція екзогенних послідовностей нуклеїнових кислот полегшується за допомогою геномної інтеграції полінуклеотидної послідовності, яка містить кілька цільових сайтів для однієї або більше нуклеаз, наприклад, нуклеази цинкового пальця (ZFN) у геномі клітини. Полінуклеотиди (які також називаються в даному документі сайтом множинної інсерції) надають можливість специфічного цільового дволанцюгового розщеплення в геномі клітини, де
15 дволанцюгове розщеплення, у свою чергу, приводить до інтеграції екзогенної послідовності (послідовностей) як через гомологічнозалежні механізми, так і через гомологічнонезалежні механізми.

[0011] Так, в одному аспекті тут розкриті молекули нуклеїнової кислоти, також відомі як сайти множинної інсерції, що включають один або більше цільових сайтів для нуклеаз, таких як
20 нуклеази цинкового пальця (ZFN). У деяких варіантах втілення цільові сайти не є присутніми в ендегенному геномі, у який інтегрований сайт множинної інсерції. Сайт множинної інсерції може включати один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім або більше цільових сайтів для нуклеаз. У деяких варіантах втілення димеризація напівдоменів розщеплення двох зв'язуючих ДНК-зв'язуючих білків, які зв'язуються із сусідніми цільовими сайтами (спарені цільові сайти), є
25 необхідною для розщеплення (наприклад, для розщеплення необхідна пара нуклеаз, одна, що зв'язується з кожним сайтом). У будь-якому із сайтів множинної інсерції, описаних тут, один цільовий сайт із кожної пари цільових сайтів може містити ту ж послідовність. Див., наприклад, Фігуру 1. У деяких варіантах втілення цільові сайти щонайменше однієї пари є однаковими. В інших варіантах втілення щонайменше одна пара цільових сайтів містить індивідуальні цільові
30 послідовності з різних цілей (наприклад, з різних генів і/або генів з різних організмів). У деяких варіантах втілення щонайменше один із парних цільових сайтів містить послідовність, обрану із групи, що складається з SEQ ID Nos: 1-20. У деяких варіантах втілення сайт множинної інсерції може містити в собі ще одну кодуєчу послідовність, наприклад одиницю транскрипції рослини (ОТР) що включає послідовність, яка кодує фосфінотрицин ацетилтрансферазу (ФАТ), або
35 скринінг маркер для використання в клітинах ссавців.

[0012] Сайти множинної інсерції інтегруються в геном клітини (наприклад, клітини рослини або ссавця), щоб забезпечити геномні мішені для нуклеаз (наприклад, ZFN). У деяких варіантах втілення цільові сайти розташовані так, що одна або більше пар нуклеаз цинкового пальця зв'язують і розщеплюють, як гомодімери. В інших варіантах втілення цільові сайти розташовані
40 так, що одна або більше пара нуклеаз цинкового пальця зв'язують і розщеплюють, як гетеродімери.

[0013] В іншому аспекті тут розкриті рослини або насіння, що містять один або більше сайтів множинної інсерції, як описано тут, і/або одну або більше екзогенних послідовностей, інтегрованих у сайт множинної інсерції. У деяких варіантах втілення сайт множинної інсерції і/або екзогенна(і) послідовність(і) буде(будуть) інтегрована(і) у гаметофіт рослини кукурудзи.
45

[0014] У деяких аспектах тут надані модифіковані клітинні лінії ссавців, модифіковані первинні клітини, модифіковані стовбурові клітини і/або трансгенні тварини, що містять один або більше сайтів множинної інсерції, як описано тут, і/або одну або більше екзогенних послідовностей, інтегрованих у сайт множинної інсерції.

50 [0015] В іншому аспекті тут наданий спосіб інтегрування екзогенних послідовностей у сайт множинної інсерції, інтегрований у геном клітини (наприклад, клітини рослини або ссавця); спосіб, що включає: (а) інтеграцію сайту множинної інсерції полінуклеотиду, який містить один або більше цільових сайтів для нуклеаз, у геном клітини, (б) надання і/або експресування однієї або більше нуклеаз, які зв'язуються з першим цільовим сайтом у сайті множинної інсерції полінуклеотиду, у такий спосіб, що зв'язування нуклеаз(и) з їх цільовими сайтами розщеплює
55 геном клітини, і (в) контактування клітини з полінуклеотидом, який містить послідовність екзогенної нуклеїнової кислоти, що приводить у результаті до залежної від гомології інтеграції екзогенної послідовності в геном клітини в межах сайту множинної інсерції полінуклеотиду.

60 [0016] В іншому аспекті тут наданий спосіб інтегрування декількох екзогенних послідовностей у геном клітини (наприклад, клітини рослини або ссавця); спосіб, що включає:

(а) інтеграцію у геном клітини першого сайту множинної інсерції полінуклеотиду, який містить один або більше цільових сайтів для нуклеаз, де перший сайт множинної інсерції полінуклеотиду містить щонайменше один перший ген в оточенні цільових сайтів для першої й другої нуклеаз, і (б) експресування першої або другої нуклеаз у клітині в присутності другого сайту множинної інсерції полінуклеотиду, що містить щонайменше один другий ген в оточенні цільових сайтів для третьої й четвертої нуклеаз, що приводить у результаті до інтеграції першого і другого гена в геном клітини. У деяких варіантах втілення спосіб додатково включає повторення, один раз або більше, кроку експресії відповідних нуклеаз, присутніх на вставлених сайтах множинної інсерції для інтеграції додаткових екзогенних послідовностей, включаючи, кодує послідовності і/або сайти нуклеази. Нуклеази можуть являти собою гетеродімерні ZFN, і може існувати один мономер, як правило, між однією або між кількома нуклеазами. У деяких варіантах втілення екзогенна послідовність ДНК для інсерції може містити половину цільового сайту ZFN, так, що при інтеграції екзогенної послідовності, створюється новий цільовий сайт ZFN, який містить половину цільового сайту, пов'язану з донорною ДНК, а половину цільового сайту - пов'язану з геномною ДНК. Цей новий цільовий сайт ZFN може слугувати в якості цільового сайту для схожої нової гетеродімерної ZFN.

[0017] В іншому аспекті тут розкритий спосіб експресування продукту однієї або більше екзогенних послідовностей нуклеїнових кислот у клітині (наприклад, у клітині рослини або ссавця), що включає: інтеграцію однієї або більше екзогенних послідовностей нуклеїнових кислот відповідно до кожного зі способів, описаних тут, таким чином, що екзогенна послідовність інтегрується в геном клітини в інтегрованій молекулі нуклеїнової кислоти, і експресується продукт екзогенної послідовності.

[0018] Також надається спосіб видалення одного або більше генів, вставлених у геном клітини; спосіб, що включає інтеграцію великої кількості екзогенних послідовностей кожним зі способів, описаних тут, і експресування відповідних нуклеаз у клітині таким чином, що одна або більше екзогенних послідовностей видаляються з геному. У деяких варіантах втілення видалені екзогенні послідовності являють собою маркерні гени. У деяких варіантах втілення делеція екзогенних послідовностей і наступне повторне з'єднання кінців у межах геному створює функціональний ген або послідовність у геномному розташуванні, наприклад, створення скринінгового маркера, що експресується.

[0019] У ще одному аспекті описаний спосіб надання геномно зміненої клітини, спосіб, що включає інтеграцію і/або висічення однієї або більше екзогенних послідовностей нуклеїнових кислот у першій клітині відповідно до кожного зі способів, описаних тут, надання можливості першій клітині розвинути в перший статевозрілий організм, схрещування зазначеного організму із другим організмом, що містить геномні зміни в алейних позиціях, щоб створити другу клітину з геномними змінами першого і другого організмів. У деяких варіантах втілення організм(и) є рослиною(ами). В інших варіантах втілення організм(и) являє(являють) собою трансгенні тварини.

[0020] У кожному зі способів, описаних тут, способи можуть бути використані в комбінації з іншими способами зміни геному, включаючи цільову інтеграцію і/або цільову інактивацію в одному або в більшій кількості ендегенних локусів. Більше того, у кожному зі способів, описаних тут, нуклеаза може містити один або більше гібридних білків, що містять зв'язуючий домен типу цинкового пальця і напівдомен розщеплення, де зв'язуючий домен типу цинкового пальця був розроблений для зв'язування із цільовим сайтом у сайті множинної інсерції. Більше того, у кожному із цих способів екзогенна послідовність нуклеїнової кислоти містить одну або більше послідовностей, яка (які) є гомологічною (гомологічними) послідовностям у сайті множинної інсерції і/або ендегенними послідовностями в регіоні, в який інтегрований сайт множинної інсерції.

[0021] У будь-якому зі способів, описаних тут, один або більше сайтів множинної інсерції можуть бути інтегровані в геном за допомогою будь-якого придатного способу, наприклад, за допомогою цільової інтеграції за допомогою нуклеази (наприклад, ZFN) з використанням ZFN, які націлюються на ендегенний ген, у якому інсерція є бажаною. Крім того, один або більше сайтів множинної інсерції можуть бути випадковим чином інтегровані в геном клітини за допомогою стандартних способів.

[0022] Екзогенна послідовність нуклеїнової кислоти може містити послідовність, що кодує один або більше функціональних поліпептидів (наприклад, кДНК), з одним або більше промоторами або без них, і/або може виробляти одну або більше РНК послідовностей (наприклад, за допомогою однієї або більше касет експресії мшРНК, які додають організму бажані ознаки. Такі ознаки у рослин включають, не обмежуючись цим, резистентність або толерантність до гербіцидів, резистентність або толерантність до комах-шкідників,

резистентність або толерантність до захворювань (вірусних, бактеріальних, грибових, нематодних), стресостійкість і/або опір стресу, про що свідчить опір або резистентність до посухи, жару, заморозку, підвищеної вологості, сольового стресу, окисного стресу; підвищена врожайність, вміст харчових продуктів і склад, зовнішній вигляд, чоловіча безплідність, висушування, витривалість, плідність, кількість і якість крохмалю; кількість і якість масла, якість і кількість білка; амінокислотний склад і таке інше. Звичайно, будь-які дві або більше екзогенні нуклеїнові кислоти будь-якого виду, наприклад, ті, які надають резистентність до гербіцидів, комах, захворювань (вірусних, бактеріальних, грибових, нематод) або посухостійкість, чоловічу безплідність, висушування, витривалість, плідність, властивості крохмалю, кількість і якість масла або ті, що підвищують врожайність і поживну цінність, можуть бути використані за бажанням. У деяких варіантах втілення екзогенна послідовність нуклеїнової кислоти містить послідовність, що кодує білок, стійкий до гербіцидів (наприклад, ген ААД (арилоксиалканоат діоксигеназа)), і/або її функціональні фрагменти. Експресія інтегрованої послідовності може бути обумовлена промотором, функціонально пов'язаним з інтегрованою послідовністю. Альтернативно інтегрована послідовність є безпромоторною, а транскрипція обумовлена ендогенним промотором у регіоні інсерції сайту множинної інсерції полінуклеотиду. В інших варіантах втілення розщеплення і неточне відновлення сайту зв'язування може інактивувати або активувати гени, що становлять інтерес. У деяких варіантах втілення полінуклеотид являє собою плазмиду. В інших варіантах втілення полінуклеотид є лінійною ДНК молекулою.

[0023] У клітинах ссавців способи й композиції винаходу можуть бути використані для конструкції клітинних ліній, наприклад, для конструкції клітинних ліній, що експресують мультимірні поліпептиди, такі як антитіла. У деяких варіантах втілення клітинні лінії можуть бути використані для дослідницьких цілей, наприклад для конструкції клітинних ліній, що експресують елементи шляху метаболізму, які становлять інтерес. У деяких варіантах втілення первинні клітини або стовбурові клітини можуть бути використані, щоб експресувати мультимірні білки, які становлять інтерес для цілей клітинної терапії.

[0024] В іншому аспекті тут надані способи вимірювання активності нуклеази цинкового пальця. У деяких варіантах втілення спосіб включає: (а) надання щонайменше однієї нуклеази цинкового пальця і молекули нуклеїнової кислоти, як описано тут, де кожний з парних цільових сайтів включає дві нуклеази цинкового пальця половини цільових сайтів, з якими нуклеаза цинкового пальця зв'язана, і вирізаний сайт, який вирізається зв'язаною нуклеазою цинкового пальця, де вирізаний сайт розташований між половинами цільових сайтів; (б) об'єднання нуклеази цинкового пальця з нуклеїновою кислотою, таким чином, що нуклеаза цинкового пальця розщеплює парні цільові сайти щонайменше в межах вирізаного сайту; (в) секвенування щонайменше вирізаного сайту для генерування даних про послідовність; і (г) порівняння в даних про послідовність кількості й довжини делецій пар основ у вирізаному сайті з кількістю і довжиною делецій пар основ у вирізаному сайті під час відсутності нуклеази цинкового пальця, щоб, таким чином, виміряти активність нуклеази цинкового пальця в парних цільових сайтах. У деяких варіантах втілення делеція більше ніж однієї пари основ указує на підвищену активність нуклеази (нуклеаз) цинкового пальця.

[0025] У ще інших варіантах втілення тут надані способи оптимізації активності нуклеази цинкового пальця в парних цільових сайтах. У деяких варіантах втілення способи включають (а) надання щонайменше однієї нуклеази цинкового пальця і молекули нуклеїнової кислоти, як описано тут, де кожний з парних цільових сайтів включає дві нуклеази цинкового пальця половини цільових сайтів, з якими нуклеаза цинкового пальця зв'язана, і вирізаний сайт, який вирізається зв'язаною нуклеазою цинкового пальця, де вирізаний сайт розташований між половинами цільових сайтів; (б) комбінування однієї або більше нуклеаз цинкового пальця з нуклеїновою кислотою таким чином, що нуклеаза цинкового пальця розщеплює парні цільові сайти щонайменше в межах вирізаного сайту; (в) визначення рівня активності нуклеази цинкового пальця на вирізаному сайті; (г) зміни кількості пар основ у вирізаному сайті; (д) повторення кроків (б)-(г) безліч разів; і (е) вибір для включення в нуклеїнову кислоту вирізаного сайту, який містить таку кількість пар основ, що забезпечує найвищий рівень активності нуклеази цинкового пальця, тим самим оптимізуючи активність нуклеази цинкового пальця на парному цільовому сайті.

[0026] У кожному із способів, описаних тут, що залучають нуклеази цинкового пальця, перший і другий напівдомени розщеплення походять із типу IIS рестрикції ендонуклеази, наприклад, FokI або SttI. Більше того, у будь-якому зі способів, описаних тут, щонайменше один із гібридних білків може містити зміни в амінокислотній послідовності інтерфейсу димеризації напівдомени розщеплення, наприклад, такі, що утворюються облігатні гетеродимери напівдомени розщеплення.

[0027] У кожному зі способів, описаних тут, рослинна клітина може включати однодольну або дводольну рослинну клітину. У деяких варіантах втілення рослинна клітина являє собою культурну рослину, наприклад, кукурудзу. У деяких варіантах втілення клітина може включати клітину ссавців, таку як первинна клітина, лінія клітин або стовбурова клітина. У деяких варіантах втілення клітинна лінія ссавців може використовуватися для виробництва поліпептидів, що становлять інтерес.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

[0028] Фігура 1 є схематичним зображенням типового сайту множинної інсерції, як описано тут. Фігура 1 демонструє сайт множинної інсерції, складений з 7 ZFN цільових сайтів. ZFN пари, які зв'язуються із цільовими сайтами, відображаються у вигляді геометричних фігур. "Блок 1" являє собою екзогенну послідовність, яка інтегрована в сайт множинної інсерції в присутності відповідної пари ZFN, зберігаючи при цьому цільові сайти ZFN (затінені й клітчасті трикутники). Фігура 1 демонструє інтеграцію "Блока 1" у сайт множинної інсерції в присутності відповідної пари ZFN замість цільових сайтів ZFN.

[0029] Фігура 2 є схематичним зображенням типового сайту множинної інсерції, як показано на Фігурі 1, на якій "Блок 2" являє собою екзогенну послідовність, яка інтегрована в сайт множинної інсерції в присутності відповідної пари ZFN.

[0030] Фігура 3 є схемою внутрішньоалельної рекомбінації, посиленої за допомогою ZFN. Дві вставки на ідентичних місцях розташування геному, але зміщені відносно одна одної, можуть піддаватися гомологічній рекомбінації або обміну ланцюгів після дволанцюгового розщеплення за допомогою ZFN. Пара ZFN (з обома мономерами ZFN, що експресуються разом) може бути надана шляхом схрещування рослин, які експресують пару ZFN, з рослинами, що містять обидві алелі разом, або шляхом введення двох мономерів ZFN від двох сторін гібрида в рослини, що містять одну алель.

[0031] Фігура 4 є схематичним зображенням використання гетеродімерних ZFN "лівого" і "правого" цільових доменів. Верхня лінія відображає геном з лівим і правим цільовими ZFN доменами (затінений трикутник і шаховий трикутник). Коли відповідна пара ZFN додана в присутності екзогенних молекул, що включають ген в оточенні різних гетеродімерних пар, ген і оточуючі нуклеазні сайти вводяться в геном так, як показано.

[0032] Фігура 5 є схематичним зображенням інтеграції і ексцизії екзогенних послідовностей (зображуються як "гени") на будь-якій стороні геномно інтегрованої послідовності. Додані гени оточені регіонами гомології, щоб направити касети генів у відповідний сайт. Дві половини ZFN цільового сайту, використовувані для інсерції, рекомбінують за допомогою створення двох нових комбінацій у вставній ДНК. Ексцизія касети гена здійснюється шляхом зв'язування відповідних пар ZFN для того, щоб розщеплювати на фланкуючих ZFN цільових сайтах. Ексцизія може вимагати шаблон, що містить гомологічні плечі, щоб запобігти делеції бажаної послідовності ДНК. Кожний "ген" може включати одну або більше послідовностей, наприклад, одну або більше кодуєвих послідовностей.

[0033] Фігура 6 є схематичним зображенням ексцизії і "повторного використання" вставних маркерних генів з використанням ZFN гетеродімерів (зображуються як трикутники з різними відтінками)

[0034] Фігура 7 являє собою карту плазміди pDAB105900.

[0035] Фігура 8 являє собою карту плазміди pDAB105908.

[0036] Фігура 9 являє собою діаграму касети експресії гомодімеру нуклеази цинкового пальця.

[0037] Фігура 10 являє собою діаграму касети експресії гетеродімеру нуклеази цинкового пальця.

[0038] Фігура 11 демонструє eZFN активність розщеплення в кукурудзі, як визначено за частотою делецій у результаті з'єднання негомологічних кінців після розщеплення.

[0039] Фігура 12 демонструє eZFN активність розщеплення в тютюні, як визначено за частотою делецій у результаті з'єднання негомологічних кінців після розщеплення.

[0040] Фігура 13 являє собою схему двох трансгенних вставок у той самий генетичний локус. Верхня лінія показує випадкову послідовність, маркіровану CMI для сайту множинної інсерції (також називану тут посадковим майданчиком), що містить eZFN сайти зв'язування, необхідні для гомологічної рекомбінації в локусі й в Блоці 1, що містить селективний маркерний ген канаміцину й оцінюваний маркерний ген ГУО. Середня лінія зображує той самий сайт множинної інсерції (CMI), що і в верхній ДНК разом із Блоком 2, який містить селективний маркерний ген стійкості до гігроміцину і селективний маркерний ген жовтої флуоресценції білка (ГФТ/ЖФБ). У нижній лінії показаний локус після рекомбінації.

[0041] Фігура 14 демонструє гомологічну рекомбінацію в алельних позиціях за допомогою

ZFN і генерацію двох різних вставок ДНК у тому ж самому генетичному локусі, який описаний у Фігурі 13. Конструкція включає Блок 1 (який містить канаміциновий і ГУО маркери, ГУО/НФТ), сайт множинної інсерції (СМІ або посадковий майданчик) і Блок 2 (який містить гігроміциновий маркер і маркер жовтої флуоресценції, ГФТ/ЖФБ), трансформований в Арабідопсис. Для створення окремо кожного блока разом із сайтом множинної інсерції в окремих рослинах, Блок 2 вирізають із інтегрованого сайту для одержання конфігурації тільки Блока 1 або Блок 1 вирізають із інтегрованого сайту для одержання конфігурації тільки Блока 2. Видалення генних блоків здійснюється шляхом схрещування рослин, що містять оригінальну трансгенну подію, з рослинами, що експресують ZFN, які розщеплюють на сайтах зв'язування eZFN, розташованих збоку від кожного генного блока. Відновлені рослини з одним блоком схрещують, щоб утворювати дві конфігурації разом в одній рослині, і цю рослину схрещують із рослиною, яка експресує мейоз-специфічний промотор, щоб впливати на обмін ДНК між двома алелями Блока 1 і Блока 2.

[0042] Фігура 15 являє собою структурну схему, що відображає кроки одержання рекомбінації між двома послідовностями ДНК, розташованими в тому самому генетичному локусі, за допомогою ZFN розщеплення на проміжному сайті між двома послідовностями. Конструкція, описана на Фігурі 16, трансформується в Арабідопсис. Один із двох генних блоків (описаних на Фігурі 14) видаляють шляхом схрещування з рослинами, що експресують eZFN, зв'язуючі сайти яких оточують блоки з боків, що приводить у результаті до рослин, які містять або Блок 1, або Блок 2.

[0043] Фігура 16 являє собою схему плазмиди, яка використовується для введення обмінного локусу в Арабідопсис. Вона містить Блоки 1 і 2, як описано на Фігурі 14, і послідовність сайту множинної інсерції. Зазначені сайти зв'язування eZFN і бічні Блоки 1 і 2 (Блок 1: eZFN 1 і 8; Блок 2: eZFN 3 і 6) або розташовані центрально в сайті множинної інсерції (eZFN 4 і 7), щоб полегшити гомологічну рекомбінацію.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

[0044] Дане розкриття належить до способів і композицій для цільової інтеграції (ЦІ) у геном, наприклад, культурної рослини, такої як кукурудза, або в клітини ссавця. Сайт множинної інсерції, що містить кілька цільових сайтів для однієї або більше нуклеаз (наприклад, ZFN) інтегрується в геном. Після інтеграції сайту множинної інсерції в геном, відповідні нуклеази вводяться в клітину разом з екзогенною послідовністю, яка повинна бути вставлена.

[0045] У деяких варіантах втілення нуклеаза(и) містить(ять) одну або більше ZFN. ZFN звичайно містять домен розщеплення (або напівдомен розщеплення) і зв'язуючий домен типу цинкового пальця і можуть бути представлені як білки, як полінуклеотиди, що кодують ці білки, або як комбінації поліпептидів і полінуклеотидів, що кодують поліпептиди. Нуклеази цинкового пальця типово функціонують як дімерні білки після дімеризації напівдоменів розщеплення. Облігатні гетеродімерні ZFN, у яких ZFN мономери зв'язуються з "лівими" і "правими" доменами розпізнавання, можуть з'єднуватися, щоб сформувати активну нуклеазу, яка була описана. Див., наприклад, патентну публікацію США № 2008/0131962. Таким чином, при даних відповідних цільових сайтах "лівий" мономер може утворювати активні ZF нуклеази з будь-яким "правим" мономером. Це значно збільшує кількість підходящих сайтів нуклеаз на основі випробуваних лівих і правих доменів, які можуть бути використані в різних комбінаціях. Наприклад, рекомбінація сайтів зв'язування 4 гомодімерних ZF нуклеаз дає 12 додаткових гетеродімерних ZF нуклеаз. Більш істотно, вона уможливорює системний підхід до трансгенного дизайну таким чином, що кожна нова введена послідовність стає оточеною збоку унікальним сайтом ZFN, який може бути використаний для відхилення від видалення гена або для націлювання на додаткові гени поряд із ним. Крім того, цей спосіб може спрощувати стратегії укладання в один локус, який управляється ZFN-залежними дволанцюговими розривами.

[0046] Зв'язуючий домен типу цинкового пальця може бути канонічним (C2H2) цинковим пальцем або неканонічним (наприклад, C3H) цинковим пальцем. Більше того, зв'язуючий домен типу цинкового пальця може містити один або більше цинкових пальців (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше цинкових пальців) і може бути розроблений, щоб зв'язуватися з будь-якою послідовністю в межах сайту множинної інсерції. Присутність такого гібридного білка (або білків) у клітинах приводить до зв'язування гібридного білка (гібридних білків) з його (їх) сайтом (сайтами) зв'язування і розщеплення в межах сайту множинної інсерції, що приводить у результаті до інтеграції екзогенної послідовності(їй).

Загальні положення

[0047] Здійснення на практиці способів, а також підготовка й використання композицій, описаних тут, використовує, якщо не зазначене інше, звичайні способи в молекулярній біології, біохімії, структурі й аналізі хроматину, обчислювальній хімії, культивуванні клітин,

рекомбінантних ДНК і суміжних галузях, які входять у сферу спеціальних знань у даній галузі техніки. Ці способи повністю описані в літературі. Див., наприклад, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 і періодичні коригування; серії METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; і METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Визначення

[0048] Терміни "нуклеїнова кислота", "полінуклеотид" і "олігонуклеотид" є взаємозамінними і належать до дезоксирибонуклеотидного або рибонуклеотидного полімеру в лінійній або круговій конформації і в одно- або дволанцюговій формі. Для цілей даного розкриття ці терміни не повинні тлумачитись як обмежуючі у відношенні довжини полімеру. Терміни можуть охоплювати відомі аналоги природних нуклеотидів, а також нуклеотиди, які є модифікованими у фрагментах основ, цукрів і/або фосфатів (наприклад, фосфоротіоатні каркаси). Взагалі аналог специфічного нуклеотиду має ту ж саму специфіку спарювання основ, тобто аналог А буде спаровуватися з Т.

[0049] Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовуються як синоніми для позначення полімеру амінокислотних залишків. Цей термін також належить до амінокислотних полімерів, у яких одна або більше амінокислот являють собою хімічні аналоги або модифіковані похідні відповідних природних амінокислот.

[0050] "Зв'язування" належить до послідовність-специфічної нековалентної взаємодії між макромолекулами (наприклад, між білком і нуклеїною кислотою). Не всі компоненти зв'язуючої взаємодії повинні бути послідовність-специфічними (наприклад, контакти з фосфатними залишками в кістяку ДНК), доти, поки взаємодія в цілому є послідовність-специфічною. Така взаємодія, як правило, характеризується константою дисоціації (Kd), яка дорівнює 10⁻⁶ М⁻¹ або нижче. "Спорідненість" належить до сили зв'язування: підвищена спорідненість зв'язування корелює з більш низькою Kd.

[0051] "Зв'язуючий білок" являє собою білок, який здатний зв'язуватися з іншою молекулою. Зв'язуючий білок може зв'язуватися, наприклад, з молекулою ДНК (ДНК-зв'язуючий білок), молекулою РНК (РНК-зв'язуючий білок) і/або молекулою білка (білок-зв'язуючий білок). У випадку білок-зв'язуючого білка, він може зв'язуватися із самим собою (для утворення гомодімерів, гомотримерів і т.д.) і/або він може зв'язуватися з однією або більше молекулами іншого білка або білків. Зв'язуючий білок може володіти більше ніж одним типом зв'язуючої активності. Наприклад, білки типу цинкового пальця володіють ДНК-зв'язуючою, РНК-зв'язуючою і білок-зв'язуючою активністю.

[0052] "ДНК-зв'язуючий білок типу цинковий палець" (або зв'язуючий домен) являє собою білок або домен у межах більшого білка, який зв'язує ДНК послідовність-специфічним способом через один або більше цинкових пальців, які є регіонами амінокислотної послідовності в зв'язуючому домені, структура якого стабілізована шляхом координації іона цинку. Термін ДНК-зв'язуючий білок типу цинковий палець часто скорочують як білок "цинковий палець" або ZFP.

[0053] Зв'язуючі домени типу цинковий палець можуть бути "розроблені" для зв'язування із предетермінованою нуклеотидною послідовністю. Необмежуючі приклади способів розробки білків типу "цинковий палець" являють собою конструювання й селекцію. Сконструйований білок "цинковий палець" являє собою білок, що не зустрічається в природі, чия конструкція/композиція є результатом, головним чином, раціональних критеріїв. Раціональні критерії конструювання включають застосування правил заміщення і комп'ютеризованих алгоритмів обробки інформації в базі даних, зберігання інформації про існуючі дані, про ZFP конструкції і про зв'язування. Див., наприклад, патенти США під номерами 6140081, 6453242 і 6534261, див. також патентні заявки WO 98/53058, WO 98/53059, WO 98/53060, WO 02/016536 і WO 03/016496.

[0054] "Вибраний" білок типу "цинковий палець" являє собою білок, що не зустрічається в природі, виробництво якого, у першу чергу, впливає з результатів емпіричного процесу, такого як фаговий дисплей, фільтр взаємодії або гібридна селекція. Див., наприклад, патенти під номерами US 5789538, US 5925523, US 6007988, US 6013453, US 6200759, WO 95/19431, WO 96/06166, WO 98/53057, WO 98/54311, WO 00/27878, WO 01/60970, WO 01/88197 і WO 02/099084.

[0055] Термін "послідовність" належить до нуклеотидної послідовності будь-якої довжини, яка може являти собою ДНК або РНК, може бути лінійною, круговою або розгалуженою і може

бути одноланцюговою або дволанцюговою. Термін "донорна послідовність" належить до нуклеотидної послідовності, яка вставлена в геном. Донорна послідовність може бути будь-якої довжини, наприклад, довжиною між 2 і 10000 нуклеотидами (або будь-яким цілим числом між ними або вище їх), краще - довжиною від 100 до 1000 нуклеотидів (або будь-яким цілим числом між ними), більш краще - довжиною приблизно від 200 до 500 нуклеотидів.

[0056] Термін "гомологічна неідентична послідовність" належить до першої послідовності, яка розділяє ступінь ідентичності послідовності із другою послідовністю, але чия послідовність не ідентична такій у другій послідовності. Наприклад, полінуклеотид, що містить послідовність дикого типу мутантного гена, є гомологічним і неідентичним послідовності мутантного гена. У деяких варіантах втілення ступінь гомології між двома послідовностями є достатньою для надання можливості гомологічної рекомбінації між ними, використовуючи нормальні клітинні механізми. Дві гомологічні неідентичні послідовності можуть бути будь-якої довжини, і ступінь їх негомологічності може бути настільки маленькою, як єдиний нуклеотид (наприклад, для корекції геномних точкових мутацій за допомогою цільової гомологічної рекомбінації), або настільки великий, як 10 тисяч або більше пар нуклеотидів (наприклад, для інсерції гена в предетермінований ектопічний сайт у хромосомі). Два полінуклеотиди, що містять гомологічні неідентичні послідовності не повинні бути однакової довжини. Наприклад, може бути використаний екзогенний полінуклеотид (наприклад, донорний полінуклеотид), якій дорівнює від 20 до 10000 нуклеотидів або нуклеотидних пар.

[0057] Способи визначення ідентичності послідовності нуклеїнових кислот і амінокислот є відомими в даній галузі техніки. Як правило, такі способи включають визначення нуклеотидної послідовності мРНК гена і/або визначення амінокислотної послідовності, закодованої таким чином, і порівняння цих послідовностей із другою нуклеотидною або амінокислотною послідовністю. Геномні послідовності також можна визначити і порівняти в такий спосіб. Взагалі ідентичність належить до точної відповідності нуклеотиду нуклеотидові або амінокислоти амінокислоті двох полінуклеотидних або поліпептидних послідовностей, відповідно. Дві послідовності або більше (полінуклеотидні або амінокислотні) можна порівняти з визначенням відсотка їх ідентичності. Відсоток ідентичності двох послідовностей, які являють собою послідовності нуклеїнових кислот або амінокислот, дорівнює кількості точних збігів між двома вирівняними послідовностями, розділених на довжину більш короткої послідовності і помножений на 100. Приблизне вирівнювання послідовностей нуклеїнових кислот забезпечується алгоритмом локальної гомології відповідно до роботи Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981). Цей алгоритм може бути застосований до амінокислотних послідовностей за допомогою використання оцінної матриці, розробленої Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, і нормалізованої Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763 (1986). Типове здійснення цього алгоритму, для того, щоб визначити відсоток ідентичності послідовності, забезпечується Genetics Computer Group (Madison, WI) в обслуговуючій програмі "BestFit". Придатні програми для розрахунків відсотка ідентичності або подібності між послідовностями, як правило, є відомими в даній галузі техніки, наприклад, іншою програмою вирівнювання є програма BLAST, яка використовує значення параметрів за замовчуванням. Наприклад, програми BLASTN і BLASTP можуть бути застосовані з використанням наступних параметрів за замовчуванням: genetic code=standard, filter=none, strand=both, cutoff=60, expect=10, Matrix=BLOSUM62, Descriptions=50 sequences, sort by=HIGH SCORE, Databases=non-redundant, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss protein+Spupdate+PIR. Докладну інформацію про ці програми можна знайти в Інтернеті. Що стосується послідовностей, описаних тут, діапазон бажаного ступеня ідентичності послідовності становить приблизно від 80 % до 100 % і будь-яке ціле значення між ними. Як правило, відсоток ідентичності між послідовностями становить щонайменше 70-75 %, краще - 80-82 %, більш краще - 85-90 %, ще більш краще - 92 %, ще більш краще 95 % і найкраще - 98 % ідентичності послідовності.

[0058] Крім того, ступінь подібності послідовності між полінуклеотидами може бути визначена шляхом гібридизації полінуклеотидів в умовах, що дозволяють формування стабільних дуплексів між гомологічними регіонами, з наступним переварюванням одноланцюговою специфічною нуклеазою (нуклеазами) і визначенням розміру переварених фрагментів. Дві нуклеїнові кислоти або дві поліпептидні послідовності є по суті гомологічними одна одній, якщо послідовності демонструють щонайменше приблизно 70 %-75 %, переважно - 80 % -82 %, більш краще - 85 % -90 %, ще більш краще - 92 %, ще більш краще - 95 % і найкраще - 98 % ідентичності послідовності по визначеній довжині молекул, як визначається використанням вищевказаних способів. Як використовується тут, позначення "по суті

гомологічні" також належить до послідовностей, що демонструють повну ідентичність із зазначеною ДНК або поліпептидною послідовністю. Послідовності ДНК, які є по суті гомологічними, можуть бути ідентифіковані в експерименті гібридизації по Саузерну, наприклад, в точних умовах, як вони визначені для даної конкретної системи. Визначення необхідних умов гібридизації знаходиться в межах кваліфікації в даній галузі техніки. Див., наприклад, роботу Sambrook et al., раніше; *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, editors B. D. Hames and S. J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

[0059] Селективна гібридизація двох фрагментів нуклеїнової кислоти може бути визначена наступним способом. Ступінь ідентичності послідовності між двома молекулами нуклеїнової кислоти впливає на ефективність і силу подій гібридизації між цими молекулами. Частково ідентична послідовність нуклеїнової кислоти буде щонайменше частково інгібувати гібридизацію повністю ідентичної послідовності з молекулою-мішенню. Інгібування гібридизації повністю ідентичної послідовності можна оцінити за допомогою аналізів гібридизації, які добре відомі в даній галузі техніки (наприклад, Саузерн (ДНК) блот, Норзерн (РНК) блот, гібридизація в розчині й т.п., див. роботу Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Такі аналізи можуть проводитися з використанням різних ступенів селективності, наприклад, з використанням умов, що змінюються від низького до високого рівня точності. Якщо використовуються умови низької точності, відсутність неспецифічного зв'язування може бути оцінене з використанням вторинного зонда, який не має навіть часткового ступеня ідентичності послідовності (наприклад, зонд, що має менше 30 % ідентичності послідовності з молекулою-мішенню), так, що за відсутності подій неспецифічного зв'язування вторинний зонд не буде гібридизуватися до цілі.

[0060] При використанні системи виявлення на основі гібридизації вибирають такий зонд нуклеїнової кислоти, який є комплементарним до еталонної послідовності нуклеїнових кислот, а потім, шляхом добору відповідних умов, зонд і еталонну послідовність селективно гібридизують або зв'язують один з одним, щоб утворити дуплексну молекулу. Молекула нуклеїнової кислоти, яка здатна до вибіркової гібридизації з еталонною послідовністю в помірно точних умовах гібридизації, звичайно гібридизується в умовах, які дозволяють виявляти цільову послідовність нуклеїнових кислот, яка за довжиною дорівнює щонайменше приблизно 10-14 нуклеотидам, які мають щонайменше близько 70 % ідентичності з послідовністю обраного зонда нуклеїнових кислот. Точні умови гібридизації звичайно надають можливість виявлення цільової послідовності нуклеїнових кислот, які за довжиною дорівнюють щонайменше приблизно 10-14 нуклеотидам, що мають більше ніж приблизно 90-95 % ідентичності з послідовністю обраного зонда нуклеїнових кислот. Умови гібридизації, що підходять для гібридизації зонд/еталонна послідовність, де зонд і еталонна послідовність мають певний ступінь ідентичності послідовності, можуть бути визначені відомими в даній галузі техніки способами (див., наприклад, роботу *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, редактори B. D. Hames and S. J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

[0061] Умови гібридизації є добре відомими фахівцям у даній галузі техніки. Точність гібридизації належить до ступеня, у якому умови гібридизації не сприяють утворенню гібридів, які містять помилкове спарювання нуклеотидів, з більш високою точністю, пов'язаною з більш низькою толерантністю до помилково спарених гібридів. Фактори, що впливають на точність гібридизації, добре відомі фахівцям у даній галузі техніки і включають, не обмежуючись цим, температуру, рівень рН, іонну силу і концентрацію органічних розчинників, таких як, наприклад, формамід і диметилсульфоксид. Як відомо фахівцям у даній галузі техніки, точність гібридизації збільшується за допомогою більш високих температур, більш низької іонної сили і більш низьких концентрацій розчинника.

[0062] Що стосується точності умов гібридизації, у даній галузі техніки добре відомо, що для створення визначеної точності можуть бути використані численні рівні умови змінення, наприклад наступних факторів: тривалості й сутності послідовностей, композиції основ різних послідовностей, концентрації солей і інших компонентів розчинів гібридизації, наявності або відсутності блокуючих речовин у розчинах для гібридизації (наприклад, декстрана сульфату і поліетиленгліколю), температури реакції гібридизації і часових параметрів, а також зміною умов промивання. Вибір конкретного набору умов гібридизації здійснюють у відповідності зі стандартними способами в даній галузі техніки (див., наприклад, роботу Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.).

[0063] Термін "рекомбінація" належить до процесу обміну генетичною інформацією між двома полінуклеотидами. Для цілей даного розкриття термін "гомологічна рекомбінація (ГР)" належить до спеціалізованої форми такого обміну, який відбувається, наприклад, під час відновлення дволанцюгових розривів у клітинах. Цей процес, що вимагає гомології

нуклеотидної послідовності, використовує "донорну" молекулу для відновлення шаблону "цільової" молекули (наприклад, тієї, яка зазнала дволанцюгового розриву) і відомий як "некрсоверна конверсія генів" або "конверсія генів короткого тракту", тому що він приводить до передачі генетичної інформації від донора до цілі, без прив'язки до будь-якої конкретної теорії, така передача може залучати корекцію помилкового спарювання гетеродуплексної ДНК, яке утворюється між розірваною мішенню й донором, і/або "синтеззалежний відпал ланцюжка", у якому донор використовується для ресинтезу генетичної інформації, яка стане частиною цілі, і/або зв'язаних процесів. Така спеціалізована ГР часто приводить у результаті до зміни послідовності цільової молекули, так, що частина або всі послідовності донорного полінуклеотиду є включеними в цільовий полінуклеотид.

[0064] Термін "розщеплення" належить до розриву ковалентного кістяка ДНК молекули. Розщеплення може бути ініційоване за допомогою різних способів, включаючи, але не обмежуючись цим, ферментативний або хімічний гідроліз фосфодієфірного зв'язку. Є можливими як одноланцюгове розщеплення, так і дволанцюгове розщеплення, і дволанцюгове розщеплення може відбутися в результаті двох різних подій одноланцюгового розщеплення. Розщеплення ДНК може привести до виробництва або затуплених кінців, або східчастих кінців. У деяких варіантах втілення гібридні поліпептиди використовуються для цільового дволанцюгового розщеплення ДНК.

[0065] "Домен розщеплення" містить одну або більше поліпептидних послідовностей, які володіють каталітичною активністю для розщеплення ДНК. Домен розщеплення може міститися в одному поліпептидному ланцюгу, або активність, що розщеплює, може виникнути в результаті об'єднання двох (або більше) поліпептидів.

[0066] "Напівдомен розщеплення" являє собою поліпептидну послідовність, яка, у комбінації із другим поліпептидом (або ідентичним, або відмінним), утворює комплекс, що володіє розщеплюючою активністю (бажане, дволанцюговою розщеплюючою активністю).

[0067] "Хроматин" є нуклеопротейною структурою, що містить клітинний геном. Клітинний хроматин містить нуклеїнову кислоту, основну ДНК і білок, включаючи гістони й негістонові хромосомні білки. Більша частина еукаріотичного клітинного хроматину існує у вигляді нуклеосом, в яких ядро нуклеосомі містить приблизно 150 пар основ ДНК, пов'язаних з октамером, який містить по два кожного з гістонів H2A, H2B, H3 і H4; і ДНК-лінкер (змінної довжини залежно від організму), розташований між ядрами нуклеосом. Молекула гістона H1, як правило, пов'язана із ДНК-лінкером. Для цілей даного розкриття термін "хроматин" призначений для охоплення всіх типів клітинних нуклеопротейдів, як прокаріотичних, так і еукаріотичних. Клітинний хроматин містить у собі як хромосомний, так і епісомний хроматин.

[0068] Хромосома являє собою хроматиновий комплекс, що містить весь геном клітини або його частину. Геном клітини часто характеризується його каріотипом, який є сукупністю всіх хромосом, що містять у собі геном клітини. Геном клітини може містити одну або більше хромосом.

[0069] "Епісома" являє собою відтворювану нуклеїнову кислоту, комплекс нуклеопротейдів або інші структури, що включають нуклеїнову кислоту, яка не є частиною хромосомного каріотипу клітини. Приклади епісом включають плазміді і деякі вірусні геноми.

[0070] "Доступний регіон" являє собою сайт у клітинному хроматині, у якому цільовий сайт, присутній в нуклеїновій кислоті, може бути зв'язаний екзогенною молекулою, яка розпізнає цільовий сайт. Не прив'язуючись до будь-якої конкретної теорії, передбачається, що доступний регіон є одним з тих, які не упаковані в нуклеосомну структуру. Окрему структуру доступного регіону часто можна виявити за його чутливістю до хімічних і ферментативних зондів, наприклад, до нуклеаз.

[0071] "Цільовий сайт" або "цільова послідовність" являє собою послідовність нуклеїнових кислот, яка визначає частину нуклеїнової кислоти, з якою буде зв'язуватися сполучна молекула, у тому випадку, якщо існують достатні для зв'язування умови. Наприклад, послідовність 5'-GAATTC-3' являє собою цільовий сайт для Eco RI ендонуклеази рестрикції.

[0072] "Екзогенна" молекула являє собою молекулу, яка звичайно не є присутньою у клітині, але може бути введена в клітину за допомогою одного або більше генетичних, біохімічних або інших способів. "Нормальна присутність у клітині" визначається відносно конкретної стадії розвитку і навколишнього середовища клітини. Так, наприклад, молекула, яка присутня тільки під час ембріонального розвитку м'язів, є екзогенною молекулою відносно дорослої м'язової клітини. Крім того, молекула, індукована за допомогою теплового шоку, є екзогенною молекулою відносно клітин, які не зазнавали теплового шоку. Екзогенна молекула може містити, наприклад, кодуючу послідовність для будь-якого поліпептиду або його фрагмента, функціонуючу версію працюючої неправильно ендегенної молекули або неправильно працюючу

версію нормально функціонуючої ендогенної молекули. Крім того, екзогенна молекула може містити, кодує послідовність із іншого виду, яка є ортологом ендогенного гена в клітині-хазяїні.

[0073] Екзогенна молекула може бути, серед іншого, малою молекулою, такою, як створена за допомогою процесу комбінаторної хімії, або макромолекулою, такою як білок, нуклеїнова кислота, вуглеводень, ліпід, глікопротеїн, ліпопротеїн, полісахарид, будь-яким модифікованим похідним вищезгаданих молекул або комплексом, який включає в себе одну або більше із вищезгаданих молекул. Нуклеїнові кислоти включають ДНК і РНК, можуть бути одно- або дволанцюговими, можуть бути лінійними, розгалуженими або круговими і можуть бути будь-якої довжини. Нуклеїнові кислоти включають ті, які здатні утворювати дуплекси, а також триплексутворюючі нуклеїнові кислоти. Див., наприклад, патенти США під номерами 5176996 і 5422251. Білки включають, не обмежуючись цим ДНК-зв'язуючі білки, транскрипційні фактори, фактори реконструкції хроматину, метиловані ДНК-зв'язуючі білки, полімерази, метилази, деметилази, ацетилази, деацетилази, кінази, фосфатази, інтегрази, рекомбінази, лігази, топоізомерази, гірази і геліази.

[0074] Екзогенна молекула може бути молекулою того ж типу, що й ендогенна молекула, наприклад, екзогенний білок або нуклеїнова кислота. Наприклад, екзогенна нуклеїнова кислота може містити інфікуючий вірусний геном, плазмиду або епісому, введені в клітину, або хромосому, яка в нормальних умовах не є присутньою в клітині. Способи введення екзогенних молекул у клітини є відомими фахівцям у даній галузі техніки і включають, не обмежуючись цим, ліпідопосередковану передачу (наприклад, ліпосоми, яка включає нейтральні й катіонні ліпіди), електропорацію, пряму ін'єкцію, злиття клітин, бомбардування частинками, спільне осадження з фосфатом кальцію, DEAE-декстранопосередковану передачу і опосередковану вірусним вектором передачу.

[0075] На противагу цьому "ендогенна" молекула являє собою ту, яка звичайно є присутньою у певній клітині на певному етапі розвитку в конкретних умовах навколишнього середовища. Наприклад, ендогенна нуклеїнова кислота може містити хромосому, геном мітохондрій, хлоропласт і інші органели або природну епісомну нуклеїнову кислоту. Додаткові ендогенні молекули можуть включати білки, наприклад, фактори транскрипції й ферменти

[0076] Як використовується тут, термін "продукт екзогенної нуклеїнової кислоти" містить у собі як полінуклеотидні, так і поліпептидні продукти, наприклад, продукти транскрипції (полінуклеотиди, такі як РНК) і продукти трансляції (поліпептиди).

[0077] Молекула "злиття" являє собою молекулу, у якій дві або більше субдинічні молекули зв'язані між собою, краще ковалентно. Субдинічні молекули можуть бути молекулами того ж хімічного типу або можуть бути молекулами різних хімічних типів. Приклади першого типу молекули злиття включають, не обмежуючись цим, гібридні білки (наприклад, злиття між ZFP ДНК-зв'язуючого домену і доменом розщеплення) і нуклеїнові кислоти злиття (наприклад, нуклеїнова кислота, що кодує гібридний білок, описаний вище). Приклади другого типу молекули злиття включають, не обмежуючись цим, злиття між триплексутворюючою нуклеїновою кислотою і поліпептидом і злиття між сполучним малої борозенки і нуклеїновою кислотою.

[0078] Експресія гібридного білка в клітині може виникнути в результаті доставки гібридного білка в клітину або в результаті доставки полінуклеотиду, що кодує гібридний білок, у клітину, де полінуклеотид транскрибується, а транскрипт транслюється, для генерування гібридного білка. Транс-сплайсинг, розщеплення поліпептиду і лігування поліпептиду може також брати участь в експресії білка в клітині. Способи доставки полінуклеотиду й поліпептиду в клітини представлені в іншому місці даного розкриття.

[0079] "Ген" для цілей даного розкриття включає ДНК-регіон, що кодує генний продукт (див. нижче), а також всі регіони ДНК, які регулюють виробництво генного продукту, незалежно від того, чи є такі регуляторні послідовності розташованими поряд із послідовностями, що кодують і/або поряд із послідовностями, що транскрибують. Відповідно, ген включає, але не обов'язково обмежується цим, промоторні послідовності, термінатори, трансляційні регуляторні послідовності, такі як сайти зв'язування рибосоми і внутрішні сайти посадки рибосоми, енхансери, сайленсери, ізолятори, граничні елементи, джерела реплікації, сайти прикріплення матриці й регіони контролю локусу.

[0080] "Експресія генів" належить до конверсії інформації, що міститься в гені, у генний продукт. Генний продукт може бути прямим транскрипційним продуктом гена (наприклад, мРНК, тРНК, рРНК, антизмістовною РНК, рибозимом, структурною РНК або будь-яким іншим типом РНК) або білком, виробленим за допомогою трансляції мРНК. Генні продукти також включають РНК, які були модифіковані за допомогою таких процесів, як кепування, поліаденілування,

метилування, редагування, і білки, модифіковані за допомогою, наприклад, метилування, ацетилювання, фосфорилювання, убівітинювання, ADP-рибозилування, міристилювання й глікозилування.

[0081] "Модуляція" експресії генів належить до зміни активності гена. Модуляція експресії може включати, не обмежуючись цим, активацію гена і пригнічення гена.

[0082] "Рослинні" клітини включають, не обмежуючись цим, клітини односім'ядольних (однодольних) або двосім'ядольних (дводольних) рослин. Необмежуючі приклади однодольних рослин включають зернові рослини, такі як кукурудза, рис, ячмінь, овес, пшениця, сорго, жито, цукрова тростина, ананас, цибуля, банани і кокос. Необмежуючі приклади дводольних рослин включають тютюн, помідори, соняшник, бавовник, цукровий буряк, картоплю, салат-латук, диню, сою, канолу (рапс) і люцерну. Рослинні клітини можуть походити з будь-якої частини рослини і/або з будь-якої стадії розвитку рослин.

[0083] "Регіон інтересу" являє собою будь-який регіон клітинного хроматину, такий як, наприклад, ген або некодуюча послідовність, всередині або поряд з геном, в якому бажано зв'язати екзогенну молекулу. Зв'язування може відбуватися з наміром розщеплення цільової ДНК і/або з наміром цільової рекомбінації. Регіон інтересу може бути присутнім у хромосомі, епісомі, органелярному геномі (наприклад, мітохондріальному, хлоропластному) або, наприклад, у інфікуючому вірусному геномі. Регіон інтересу може знаходитись у кодуєчому регіоні гена, у межах некодуючих регіонів, що транскрибуються, таких як, наприклад, лідерні послідовності, трейлерні послідовності або інтрони, або в межах регіонів, що не транскрибуються, або вище чи нижче від кодуєчого регіону. Регіон інтересу може бути настільки малим, як єдина нуклеотидна пара, або становити до 2000 пар нуклеотидів у довжину, або становити будь-яке ціле значення нуклеотидних пар.

[0084] Терміни "оперативний зв'язок" і "оперативно зв'язаний" (або "функціонально зв'язаний") є взаємозамінними з посиланням на зіставлення двох або більше компонентів (таких як, наприклад, елементи послідовності), де компоненти розташовані таким чином, що обидва компонента нормально функціонують і допускають можливість того, що щонайменше один із зазначених компонентів може стати посередником функції, яка приводиться в дію щонайменше одним з інших компонентів. У якості ілюстрації, транскрипційна регуляторна послідовність, така як, наприклад, промотор, є оперативно пов'язаною з кодуєчою послідовністю, якщо транскрипційна регуляторна послідовність контролює рівень транскрипції кодуєчої послідовності у відповідь на наявність або відсутність одного або більше транскрипційних регуляторних факторів. Транскрипційна регуляторна послідовність, як правило, оперативно зв'язана в сіс з кодуєчою послідовністю, але не обов'язково повинна перебувати в безпосередній близькості до неї. Наприклад, енхансер є транскрипційною регуляторною послідовністю, яка оперативно пов'язана з кодуєчою послідовністю, хоча вони і не є суміжними.

[0085] Відносно гібридних поліпептидів термін "оперативно зв'язаний" може належати до факту, що кожний з компонентів виконує ту ж функцію у зв'язку з іншим компонентом, яку виконував би, якби не був зв'язаний у такий спосіб. Наприклад, відносно гібридного поліпептиду, у якому ДНК-зв'язуючий домен ZFP зливається з доменом розщеплення, ДНК-зв'язуючий домен ZFP і домен розщеплення знаходяться в оперативному зв'язку, якщо в гібридному поліпептиді частина ДНК-зв'язуючого домену ZFP здатна зв'язувати його цільовий сайт і/або його сайт зв'язування, в той час, як домен розщеплення здатний розщеплювати ДНК поблизу цільового сайту.

[0086] "Функціональний фрагмент" білка, поліпептиду або нуклеїнової кислоти являє собою білок, поліпептид або нуклеїнову кислоту, послідовність яких не є ідентичною білку, поліпептиду або нуклеїновій кислоті повної довжини, але зберігає ту ж функцію, що й білок, поліпептид або нуклеїнова кислота повної довжини. Функціональний фрагмент може мати більше, менше або стільки ж залишків, скільки й відповідна природна молекула, і/або може містити одну або більше амінокислотних або нуклеотидних заміщень. Способи визначення функції нуклеїнових кислот (наприклад кодуєча функція, здатність гібридизуватись з іншою нуклеїновою кислотою) є добре відомими в даній галузі техніки. Крім того, добре відомими є способи визначення функції білка. Наприклад ДНК-зв'язуюча функція поліпептиду може бути визначена, наприклад, за допомогою фільтр-зв'язування, електрофоретичної рухливості зсуву або аналізів імунопреципітації. ДНК-розщеплення може бути проаналізоване за допомогою гель-електрофорезу. Див. роботу Ausubel et al., вище. Здатність білка взаємодіяти з іншим білком може бути визначена, наприклад, за допомогою одночасної імунопреципітації, двогібридних аналізів або комплементации, як генетичних, так і біохімічних. Див., наприклад, роботу Fields et al. (1989) Nature 340:245-246; патент США №. 5585245 і PCT WO 98/44350.

Сайти множинної інсерції

[0087] В даному документі розкриті сайти множинної інсерції, а саме - полінуклеотиди, що містять множину сайтів зв'язування нуклеаз цинкового пальця (ZFN), такі, що, при зв'язуванні відповідної пари ZFN, сайт множинної інсерції розщеплюється між цільовими сайтами пари ZFN.

[0088] Цільові сайти, включені в сайт множинної інсерції, краще не виявляються в геномі клітини, в яку вони інтегровані. Таким чином, виникнення небажаного розщеплення в геномі зменшується або усувається. Будь-яка кількість цільових сайтів може бути включена в сайт множинної інсерції полінуклеотиду, наприклад, 1-50 (або будь-яке число між ними), краще - від 2 до 30 (або будь-яке число між ними) і навіть більш краще - від 5 до 20 (або будь-яке число між ними). Для нуклеаз цинкового пальця цільові сайти, як правило, знаходяться у парах, так, що нуклеази цинкового пальця утворюють гомо- і гетеродімери, щоб розщеплювати відповідний сайт.

[0089] Більше того, як продемонстровано на Фігурі 1, один цільовий сайт із кожної пари цільового сайту (затінений трикутник Фігури 1) може бути однаковим по всьому сайту множинної інсерції. Крім того, гетеродімерні пари можуть бути різними між сайтами.

[0090] Сайт множинної інсерції може містити в собі цільові сайти, зв'язані тільки гомодімерами, цільові сайти, зв'язані тільки гетеродімерами, або комбінацію цільових сайтів, зв'язаних гомо- і гетеродімерами. Цільові сайти, зв'язані гомодімерами, можуть бути краще в деяких випадках з однієї або декількох з наступних причин: доставка однієї ZFN може бути більш ефективною, ніж двох; гомодімеризація зменшує проблеми нерівної стехіометрії через неоднакову експресію ZFN; токсичність від розщеплення позацільових сайтів може бути зменшена; гомодімер має у два рази більше шансів бути зруйнованим при використанні CCHC (неканонічних) доменів цинкового пальця; і/або загальна кількість унікальних сайтів націлювання може бути збільшене. Крім того, перевага може бути віддана гетеродімерам і в інших випадках, тому що вони надають можливість для змішування й приведення у відповідність різних цільових сайтів а, отже, і для потенційного збільшення сайтів, що націлюються, для ZFN пар. Крім того, гетеродімери можуть надати можливість послідовного додавання донорів, у міру необхідності практикуючим фахівцем. Гетеродімерні комбінації також можуть надати можливість для специфічної делеції будь-яких заданих секцій донорів за рахунок використання нових пар ZFN.

[0091] Буде очевидним, що для цільового сайту не є необхідним складатися із трьох нуклеотидів для нуклеаз цинкового пальця. Наприклад, у випадках, коли відбуваються взаємодії з перехреснуванням ланцюгів (див., наприклад, патент США 6453242 і WO 02/077227), один або більше окремих цинкових пальців мультипальцевого зв'язуючого домену можуть зв'язуватися з квадруплетними субсайтами, що перекриваються. У результаті трипальцевий білок може зв'язувати 10-нуклеотидну послідовність, у якій десятий нуклеотид є частиною квадруплета, зв'язаного заключним пальцем, чотирипальцевий білок може зв'язувати 13-нуклеотидну послідовність, у якій тринадцятий нуклеотид є частиною квадруплета, зв'язаного заключним пальцем, і т.д.

[0092] Довжина і природа амінокислотної лінкерної послідовності між окремими цинковими пальцями в мультипальцевому зв'язуючому домені також впливає на зв'язування із цільовою послідовністю. Наприклад, наявність так званого "неканонічного лінкера", "довгого лінкера" або "структурованого лінкера" між сусідніми цинковими пальцями в мультипальцевому зв'язуючому домені може надати можливість цим пальцям зв'язувати субсайти, які не знаходяться у безпосередній близькості. Необмежуючі приклади таких лінкерів описані, наприклад, у патенті США № 6479626 і WO 01/53480. Таким чином, один або більше субсайтів у цільовому сайті для зв'язуючого домену цинкового пальця можуть бути відділені один від одного за допомогою 1, 2, 3, 4, 5 або більше нуклеотидів. Для надання всього лише одного прикладу чотирипальцевий зв'язуючий домен може зв'язуватися з 13-нуклеотидним цільовим сайтом, що включає в себе один за іншим два суміжні 3-нуклеотидних субсайта, проміжний нуклеотид і два суміжні триплетні субсайти.

[0093] Відстань між послідовностями (наприклад, цільових сайтів) належить до кількості нуклеотидів або нуклеотидних пар, проміжних між двома послідовностями, вимірюваній від меж послідовностей, найближчих одна до одної.

[0094] У деяких варіантах втілення, у яких розщеплення залежить від зв'язування двох доменів цинкового пальця/молекул злиття напівдомену розщеплення, для того, щоб відокремити цільові сайти, два цільові сайти можуть знаходитися на протилежних ланцюгах ДНК. В інших варіантах втілення обидва цільових сайти знаходяться на одному і тому ж ланцюгу ДНК.

[0095] Сайт множинної інсерції може бути інтегрований у будь-яку точку геному рослини. У деяких варіантах втілення сайт множинної інсерції інтегрований в Zp15 у геном кукурудзи, який,

як описано в заявці на патент США № 12/653735, є бажаним сайтом для цільової інтеграції екзогенних послідовностей.

ДНК-зв'язуючі домени

[0096] Будь-який ДНК-зв'язуючий домен може бути використаний у способах, описаних тут. У деяких варіантах втілення ДНК-зв'язуючий домен містить у собі білок типу "цинковий палець". Зв'язуючий домен цинкового пальця включає один або більше цинкових пальців. Miller et al. (1985) EMBO J. 4:1609-1614; Rhodes (1993) Scientific American Feb.:56-65; патент США № 6453242. Зв'язуючі домени цинкового пальця, описані тут, звичайно включають 2, 3, 4, 5, 6 або навіть більше цинкових пальців.

[0097] Як правило, один домен цинкового пальця становить приблизно 30 амінокислот у довжину. Структурні дослідження продемонстрували, що кожний домен (мотив) цинкового пальця містить два бета-листи (утримуваних у бета-черзі, яка містить два незмінні залишки цистеїну) і альфа-спіраль (яка містить два незмінні залишки гістидину), які утримуються в тій або іншій конформації шляхом координування атома цинку за допомогою двох цистеїнових залишків і двох гістидинових залишків.

[0098] Цинкові пальці містять у собі як канонічні C_2H_2 цинкові пальці (тобто ті, у яких іон цинку координується двома залишками цистеїну і двома залишками гістидину), так і неканонічні цинкові пальці, такі як, наприклад, C_3H цинкові пальці (ті, у яких іон цинку координується трьома залишками цистеїну і одним залишком гістидину), а також C_4 цинкові пальці (ті, у яких іон цинку координується чотирма залишками цистеїну). Див. також WO 02/057293, а також патентну публікацію США № 20080182332 у відношенні неканонічних ZFP для використання в рослинах.

[0099] Інженерний зв'язуючий домен цинкового пальця може володіти новою специфічністю зв'язування в порівнянні із природним білком типу "цинковий палець". Інженерні способи включають, не обмежуючись цим, раціональне конструювання і різноманітні типи селекції. Раціональне конструювання містить у собі, наприклад, використання баз даних, що містять триплетні (або квадруплетні) нуклеотидні послідовності й окремі амінокислотні послідовності цинкового пальця, у яких кожна триплетна або квадруплетна нуклеотидна послідовність пов'язана з однією або декількома амінокислотними послідовностями типу цинкові пальці, які зв'язують конкретну триплетну або квадруплетну послідовність

[00100] Типові способи селекції, включаючи фаговий дисплей і двогібридні системи, описані в патентах США під номерами 5789538, 5925523, 6007988, 6013453, 6410248, 6140466, 6200759 і 6242568, а також у патентних заявках WO 98/37186, WO 98/53057, WO 00/27878, WO 01/88197 і GB 2338237.

[00101] Підвищення специфічності зв'язування для зв'язуючих доменів цинкового пальця було описано, наприклад, у колективній патентній заявці WO 02/077227.

[00102] Оскільки окремий цинковий палець зв'язується із тринуклеотидною (наприклад, триплетною) послідовністю (або чотиринуклеотидною послідовністю, які можуть частково перекриватися одним нуклеотидом із чотиринуклеотидним сайтом зв'язування сусіднього цинкового пальця), довжина послідовності, до якої зв'язуючий домен цинкового пальця розроблений для зв'язування (наприклад, цільова послідовність), буде зумовлювати кількість цинкових пальців у розробленому зв'язуючому домені цинкового пальця. Наприклад, для ZFP, у якому мотиви пальця не зв'язуються з субсайтами, що перекриваються, шестинуклеотидна цільова послідовність зв'язана двопальцевим зв'язуючим доменом; дев'ятинуклеотидна цільова послідовність зв'язана трипальцевим зв'язуючим доменом і т.д. Як відзначається тут, сайти зв'язування для окремих цинкових пальців (наприклад, субсайти) у цільовому сайті не повинні бути прилягаючими, але можуть бути відділені за допомогою одного або більше нуклеотидів, залежно від довжини і природи амінокислотних послідовностей між цинковими пальцями (наприклад, міжпальцевими лінкерами) у мультипальцевому зв'язуючому домені.

[00103] У мультипальцевому зв'язуючому домені цинкового пальця розташовані поряд цинкові пальці можуть бути розділені за допомогою амінокислотних лінкерних послідовностей, що складаються із приблизно 5 амінокислот (так званих "канонічних" міжпальцевих лінкерів), або, альтернативно, за допомогою одного або більше неканонічних лінкерів. Див., наприклад, патенти США під номерами 6453242 і 6534261, що знаходяться у спільному володінні. Для розроблених зв'язуючих доменів цинкового пальця, що складаються із більше ніж трьох пальців, інсерція більш довгих ("неканонічних") міжпальцевих лінкерів між певними цинковими пальцями може бути бажаною в деяких випадках, тому що це може збільшити спорідненість і/або специфічність зв'язування зв'язуючого домену. Див., наприклад, патент США № 6479626 і патентну заявку WO 01/53480. Таким чином, мультипальцеві зв'язуючі домени цинкового пальця також можуть бути охарактеризовані відносно наявності й місця розташування неканонічних міжпальцевих лінкерів. Наприклад, шестипальцевий зв'язуючий домен цинкового пальця, який

містить три пальці (приєднані за допомогою двох канонічних міжпальцевих лінкерів), довгий лінкер і три додаткові пальці (приєднані за допомогою двох канонічних міжпальцевих лінкерів) позначаються як конфігурація 2 × 3. Подібним чином зв'язуючий домен, який містить два пальці (з канонічним лінкером між ними), довгий лінкер і два додаткові пальці (приєднані за допомогою канонічного лінкера) позначаються як конфігурація 2 × 2. Білок, що містить три двопальцевих одиниці (у кожній з яких два пальці з'єднані за допомогою канонічного лінкера) і в якому кожна із двопальцевих одиниць з'єднується із сусідніми двопальцевими одиницями за допомогою довгого лінкера, називається конфігурацією 3 × 2.

[00104] Наявність довгого або неканонічного міжпальцевого лінкера між двома сусідніми цинковими пальцями в мультипальцевому зв'язуючому домені часто надає двом пальцям можливість зв'язуватися із субсайтами, які не є безпосередньо суміжними в цільовій послідовності. Відповідно, може існувати пробіл з одного або більше нуклеотидів між субсайтами в цільовому сайті, тобто цільовий сайт може містити один або більше нуклеотидів, які не зв'язані цинковим пальцем. Наприклад, 2 × 2 зв'язуючий домен цинкового пальця може зв'язуватися із двома шестинуклеотидними послідовностями, розділеними одним нуклеотидом, тобто він зв'язується з 13-нуклеотидним цільовим сайтом. Див. також роботи Moore et al. (2001a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1432-1436; Moore et al. (2001b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1437-1441 і патентну заяву WO 01/53480.

[00105] Як згадувалося раніше, цільовий субсайт являє собою три- або чотири-нуклеотидну послідовність, яка зв'язана одним цинковим пальцем. Для певних цілей двопальцева одиниця позначається як "зв'язуючий модуль". Зв'язуючий модуль може бути отриманий за допомогою, наприклад, селекції для двох сусідніх пальців у контексті мультипальцевого білка (як правило, трипальцевого), який зв'язує певну шестинуклеотидну цільову послідовність. Крім того, модулі можуть бути сконструйовані за допомогою складання окремих цинкових пальців. Див. також заявки WO 98/53057 і WO 01/53480.

[00106] Альтернативно ДНК-зв'язуючий домен може бути отриманий з нуклеази. Наприклад, відомі послідовності хомінг-ендонуклеаз і мегануклеаз, що розпізнають, такі як I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII і I-TevIII. Див. також патент США № 5420032, патент США № 6833252, роботи Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) Gene 82:115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180; Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 і New England Biolabs catalogue. Крім того ДНК-зв'язуюча специфічність, хомінг-ендонуклеаз и мегануклеаз може бути розроблена, щоб зв'язувати ненатуральні цільові сайти. Див., наприклад, роботи Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659; Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66; патентну публікацію США № 20070117128.

[00107] У якості ще однієї альтернативи ДНК-зв'язуючий домен може бути отриманий з білків з лейциновою блискавкою. Лейцинові блискавки являють собою клас білків, які беруть участь у білок-білкових взаємодіях у багатьох еукаріотичних регуляторних білках, які є важливими транскрипційними факторами, пов'язаними з генною експресією. Лейцинова блискавка належить до загальних структурних мотивів, спільно використовуваних у цих транскрипційних факторах у декількох царствах, включаючи тварин, рослини, дріжджі і т.д. Лейцинова блискавка утворюється двома поліпептидами (гомодімером або гетеродімером), які зв'язуються зі специфічними послідовностями ДНК таким чином, що залишки лейцину рівномірно розподілені по α-спіралі, так, що лейцинові залишки двох поліпептидів закінчуються на тій же поверхні спіралі. Специфічність ДНК-зв'язування лейцинових блискавок може бути використана в ДНК-зв'язуючих доменах, описаних тут.

[00108] У деяких варіантах втілення ДНК-зв'язуючий домен являє собою інженерний домен із TAL-ефектора, отриманого з рослинного патогенного мікроорганізму Xanthomonas (див. роботи Miller et al. (2010) Nature Biotechnology, Dec 22 [Epub ahead of print]; Boch et al. (2009) Science 29 Oct 2009 (10.1126/science.117881) і Moscou і Bogdanove, (2009) Science 29 Oct 2009 (10.1126/science.1178817).

Домени розщеплення

[00109] Як відзначалось вище, ДНК-зв'язуючий домен може бути зв'язаним з доменом розщеплення (нуклеазним). Наприклад, хомінг-ендонуклеази можуть бути модифіковані в їх ДНК-зв'язуючій специфічності, зберігаючи при цьому функції нуклеази. Крім того, білки типу "цинковий палець" можуть також бути стоплені з доменом розщеплення, щоб сформувати нуклеазу цинкового пальця (ZFN). Частина домену розщеплення гібридних білків, описаних тут, може бути отримана з будь-якої ендонуклеази або екзонуклеази. Типові ендонуклеази, з яких

може бути отриманий домен розщеплення, включають, не обмежуючись цим, ендонуклеази рестрикції і хомінг-ендонуклеази. Див., наприклад, 2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, MA; і роботу Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. Відомі додаткові ферменти, які розщеплюють ДНК (наприклад, S1 нуклеаза, маш (квасоля золотава) нуклеаза, панкреатична ДНаза I; мікрококова нуклеаза, HO ендонуклеаза дріжджів; див. також роботу Linn et al. (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Відомі необмежуючі приклади хомінг-ендонуклеаз і мегануклеаз включають I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. Див. також патент США № 5420032; патент США № 6833252; роботи Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) *Gene* 82:115-118; Perler et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 і New England Biolabs catalogue. Один або більше із цих ферментів (або їх функціональних фрагментів) можуть бути використані в якості джерела доменів розщеплення і напівдоменів розщеплення.

[00110] Ендонуклеази рестрикції (ферменти рестрикції) присутні в багатьох видах і здатні до зв'язування із ДНК послідовність-специфічним способом (на сайті розпізнавання), а також до розщеплення ДНК на місці зв'язування або поряд із ним. Деякі ферменти рестрикції (наприклад, Тип IIS) розщеплюють ДНК в сайтах, віддалених від сайту розпізнавання, і мають роздільні домени зв'язування і розщеплення. Наприклад, Тип IIS фермент FokI каталізує дволанцюгове розщеплення ДНК через 9 нуклеотидів від сайту розпізнавання на одному ланцюзі і через 13 нуклеотидів від сайту розпізнавання на іншому ланцюзі. Див., наприклад, патенти США під номерами 5356802, 5436150 і 5487994, а також роботи Li et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim et al. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31978-31982. Таким чином, в одному варіанті втілення гібридні білки містять домен розщеплення (або напівдомен розщеплення) із, щонайменше одного ферменту рестрикції Типу IIS і одного або більше зв'язуючих доменів цинкового пальця, які можуть бути або можуть не бути інженерними.

[00111] Типовим ферментом рестрикції Типу IIS, чий домен розщеплення є роздільним із зв'язуючим доменом, є FokI. Даний специфічний фермент активний у вигляді димеру. Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10570-10575. Таким чином, для цілей даного розкриття частина ферменту FokI, використовувана в розкритих гібридних білках, вважається напівдоменом розщеплення. Таким чином, цільове дволанцюгове розщеплення і/або цільове заміщення клітинних послідовностей за допомогою злиттів цинковий палець-FokI, два гібридні білки, кожний з яких містить напівдомен розщеплення FokI, можуть бути використані для відновлення каталітично активного домену розщеплення. Крім того, також може бути використана одна поліпептидна молекула, що містить зв'язуючий домен цинкового пальця і два напівдомени розщеплення FokI. Параметри цільового розщеплення і цільової зміни послідовності з використанням злиття цинковий палець-FokI надані в іншому місці даного розкриття.

[00112] Доменом розщеплення або напівдоменом розщеплення може бути будь-яка частина білка, яка зберігає активність, що розщеплює, або яка зберігає можливість мультимеризації (наприклад, димеризації), щоб сформувати функціональний домен розщеплення.

[00113] Типові ферменти рестрикції Типу IIS описані в Міжнародній публікації WO 2007/014275, яка перебуває в спільному володінні, і включена в даний документ як посилання в повному обсязі.

[00114] Для покращення специфічності розщеплення, домени розщеплення також можуть бути модифіковані. У деяких варіантах втілення варіанти напівдомену розщеплення, що використовують ці варіанти, мінімізують гомодимеризацію або запобігають гомодимеризації напівдоменів розщеплення. Необмежуючі приклади таких модифікованих напівдоменів розщеплення описані детально в патентній заявці WO 2007/014275, включеному в даний документ як посилання в повному обсязі. Див. також розділ Приклади. У деяких варіантах втілення домен розщеплення, що містить інженерний напівдомен розщеплення (також називаний мутантом домену димеризації), який мінімізує гомодимеризацію або запобігає їй, відомий фахівцям у даній галузі техніки і описаний, наприклад, у патентних публікаціях США під номерами 20050064474 і 20060188987, включених у даний документ як посилання в повному обсязі. Амінокислотні залишки в позиціях 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 і 538 FokI - всі являють собою мішені для впливу на димеризацію напівдоменів розщеплення FokI. Див., наприклад, патентні публікації США під номерами 20050064474 і 20060188987, міжнародну патентну публікацію WO 07/139898, роботи Miller et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25(7):778-785 і Doyon et al (2011) *Nature Methods* 8(1):74-79.

[00115] Додаткові інженерні напівдомени розщеплення FokI, які формують облігатні гетеродімери, також можуть бути використані в ZFN, описаних тут. В одному варіанті втілення перший напівдомен розщеплення включає мутації в амінокислотних залишках у позиціях 490 і 538 FokI, а другий напівдомен розщеплення включає мутації в амінокислотних залишках 486 і 499.

[00116] У деяких варіантах втілення домен розщеплення містить два напівдомени розщеплення, обидва з яких є частиною одного поліпептиду, що містить зв'язуючий домен, перший напівдомен розщеплення і другий напівдомен розщеплення. Напівдомени розщеплення можуть мати таку ж саму амінокислотну послідовність або різні амінокислотні послідовності, доти, поки вони функціонують, щоб розщеплювати ДНК.

[00117] Взагалі для розщеплення необхідні два гібридні білки, якщо гібридні білки містять напівдомени розщеплення. Альтернативно може бути використаний один білок, що містить два напівдомени розщеплення. Два напівдомени розщеплення можуть бути отримані з однієї ендонуклеази (або її функціональних фрагментів) або кожний напівдомен розщеплення може бути отриманий з різних ендонуклеаз (або їх функціональних фрагментів). Крім того, цільові сайти для двох гібридних білків краще розташовані відносно один одного так, що зв'язування двох гібридних білків з їх відповідними цільовими сайтами розташовує напівдомени розщеплення в такій просторовій орієнтації по відношенню один до одного, яка дозволяє напівдоменам розщеплення сформувати функціональний домен розщеплення, наприклад, за допомогою димеризації. Таким чином, у деяких варіантах втілення, прилеглі краї цільових сайтів розділені за допомогою 5-8 нуклеотидів або за допомогою 15-18 нуклеотидів. Однак, будь-яке ціле число нуклеотидів або нуклеотидних пар може знаходитись між двома цільовими сайтами (наприклад, від 2 до 50 нуклеотидів і більше). Взагалі точка розщеплення лежить між цільовими сайтами.

Гібридні білки

[00118] Способи дизайну і конструювання гібридних білків (і полінуклеотидів, що кодують їх же) є відомими фахівцям у даній галузі техніки. Наприклад, способи дизайну і конструювання гібридних білків, що містять ДНК-зв'язуючі домени (наприклад, домени цинкового пальця) і регуляторні домени або домени розщеплення (або напівдомени розщеплення) і полінуклеотиди, що кодують такі гібридні білки, описані в патентах США під номерами 6453242 і 6534261, що перебувають у спільному володінні, і в публікаціях заявок на патент США під номерами 2007/0134796 і 2005/0064474, які включені в даний документ як посилання у всій їх повноті. У деяких варіантах втілення полінуклеотиди, що кодують гібридні білки, є штучно сконструйованими. Ці полінуклеотиди можуть бути вставлені у вектор, а вектор може бути введений у клітину (див. нижче додаткові розкриття щодо векторів і способів введення полінуклеотидів у клітини).

[00119] У деяких варіантах втілення способів, описаних тут, нуклеаза цинкового пальця включає гібридний білок, що містить зв'язуючий домен цинкового пальця й напівдомен розщеплення з ферменту рестрикції FokI, і два такі гібридні білки експресуються в клітині. Експресія двох гібридних білків у клітині може виникнути в результаті доставки двох білків у клітину; доставки одного білка і однієї нуклеїнової кислоти, що кодує один з білків, у клітину; доставки двох нуклеїнових кислот, кожна з яких кодує один з білків, у клітину, або в результаті доставки однієї нуклеїнової кислоти, що кодує обидва білка, у клітину. У додаткових варіантах втілення гібридний білок містить один поліпептидний ланцюжок, який містить два напівдомени розщеплення, і зв'язуючий домен цинкового пальця. У цьому випадку один гібридний білок експресується в клітині й, не бажаючи бути зв'язаними теорією, як вважають, розщеплює ДНК у результаті формування внутрішньомолекулярного димеру напівдоменів розщеплення.

[00120] У деяких варіантах втілення компоненти гібридних білків (наприклад, ZFP-FokI злиття) організовані таким чином, що домен цинкового пальця є найближчим до амінокінця гібридного білка, а напівдомен розщеплення є найближчим до карбоксі-кінця. Це відображує відносну орієнтацію домену розщеплення в природних димеризованих доменах розщеплення, таких як похідні від ферменту FokI, у якому ДНК-зв'язуючий домен є найближчим до амінокінця, а напівдомен розщеплення є найближчим до карбоксі-кінця. У цих варіантах втілення димеризація напівдоменів розщеплення для того, щоб сформувати функціональну нуклеазу, викликана зв'язуванням гібридних білків із сайтами на протилежних ланцюгах ДНК із 5'-кінцями сайтів зв'язування, що знаходяться проксимально відносно один одного.

[00121] У додаткових варіантах втілення компоненти гібридних білків (наприклад, ZFP-FokI злиття) організовані таким чином, що напівдомен розщеплення є найближчим до амінокінця гібридного білка, а домен цинкового пальця є найближчим до карбоксі-кінця. У цих варіантах втілення димеризація напівдоменів розщеплення для того, щоб сформувати функціональну

нуклеазу, викликана зв'язуванням гібридних білків із сайтами на протилежних ланцюгах ДНК із 3'-кінцями сайтів зв'язування, що знаходяться проксимально відносно один одного.

[00122] У ще додаткових варіантах втілення перший гібридний білок включає напівдомен розщеплення, найближчий до амінокінця гібридного білка, і домен цинкового пальця, найближчий до карбоксі-кінця, а другий гібридний білок організований так, що домен цинкового пальця є найближчим до амінокінця гібридного білка, а напівдомен розщеплення є найближчим до карбоксі-кінця. У цих варіантах втілення обидва гібридних білка зв'язуються з одним тим самим ланцюгом ДНК, із сайтом зв'язування першого гібридного білка, що містить домен цинкового пальця, найближчий до карбоксі-кінця, розташованого на 5'-стороні сайту зв'язування другого гібридного білка, що містить домен цинкового пальця, найближчий до амінокінця.

[00123] У деяких варіантах втілення розкритих гібридних білків амінокислотна послідовність між доменом цинкового пальця і доменом розщеплення (або напівдоменом розщеплення) позначається "ZC лінкер". ZC лінкер буде відрізнятися від міжпальцевих лінкерів, про які говорилося вище. Див., наприклад, патентні публікації США під номерами 20050064474A1 і 20030232410 і міжнародну патентну публікацію WO 05/084190 для докладних відомостей про одержання ZC лінкерів, які оптимізують розщеплення.

[00124] В одному з варіантів втілення винахід надає білок по типу "цинковий палець", який містить ZFN, і який володіє однією або більше амінокислотними послідовностями спіралі розпізнавання, продемонстрованими у Таблиці 1. В іншому варіанті втілення тут наданий вектор експресії ZFP, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує ZFP, що має одну або більше спіралей розпізнавання, продемонстрованих у Таблиці 1.

Цільова інтеграція

[00125] Розкриті способи і композиції можуть бути використані для розщеплення ДНК у геномі будь-якої клітини, в яку сайт множинної інсерції був інтегрований, що сприяє стабільній цільовій інтеграції екзогенної послідовності в сайт множинної інсерції і/або ексцизії екзогенної послідовності в присутності відповідних пар ZFN. Див. Фігури 1 і 2.

[00126] Крім того, тут описані способи, у яких сайти ZFN-інсерції, як частина екзогенної послідовності, вводяться в геном клітини серіями. Див. Фігури 4 і 5. Наприклад, екзогенна послідовність, оточена з боків різними комбінаціями сайтів гетеродімерної нуклеази, вставляється в геном. Згодом ZFN-пара, яка розщеплює в одному з відповідних флангових сайтів ZFN, вводиться в клітину в присутності іншої екзогенної послідовності, яка знову містить у собі різні комбінації сайтів гетеродімерної нуклеази. Цей процес може бути повторений при бажанні вставити екзогенні послідовності. Крім того, при наявності відповідних пар ZFN, одна або більше екзогенних послідовностей можуть бути видалені з геному.

[00127] Фігура 6 демонструє інший варіант втілення, у якому екзогенна послідовність включає маркерний ген і ген, що представляє інтерес. І маркерний ген, і ген інтересу перебувають в оточенні різних ZFN-сайтів зв'язування (зображені у вигляді трикутників з різними відтінками), так, що маркерний ген може бути видалений у разі потреби, наприклад, при вставці додаткових генів. В організмах, таких як рослини, де існує обмежене число ефективних селективних маркерів, це дозволяє використовувати всього лише один селективний маркерний ген, значно полегшуючи потенціал нагромадження генів, що становлять інтерес. У деяких варіантах втілення, наприклад, залежно від ефективності спрямованого на гомологію відновлення ДНК, може бути використаний "розщеплений" селективний маркер. Правильна інтеграція донорної ДНК-послідовності, що використовує розщеплений селективний маркер, створює селективний маркерний ген, що експресується. Селективні маркери можуть бути виключені з інтегрованої послідовності ДНК і тому можуть бути використані повторно. В іншому варіанті втілення екзогенна послідовність для видалення є оточеною в геномі неповними послідовностями розщепленого маркерного гена. Після ексцизії маркерний ген знову конструюється, що приводить у результаті до створення функціонального маркерного гена. Використання ексцизії селективного маркера обмежує кількість необхідних селективних маркерів до двох або, можливо, тільки до одного.

[00128] Для цільової інтеграції в інтегрований сайт множинної інсерції, як описано тут, розроблені один або більше ДНК-зв'язуючих доменів (наприклад, ZFP) для зв'язування цільового сайту в предетермінованому сайті розщеплення або поблизу його, а гібридний білок, що містить розроблені ДНК-зв'язуючий домен і домен розщеплення, експресується в клітині. Після зв'язування ДНК-зв'язуючої частини (наприклад, цинкового пальця) гібридного білка із цільовим сайтом, ДНК розщеплюється, краще через дволанцюговий розрив, поряд із цільовим сайтом за допомогою домену розщеплення.

[00129] Присутність дволанцюгового розриву в сайті множинної інсерції полегшує інтеграцію екзогенних послідовностей за допомогою гомологічної рекомбінації. У деяких варіантах втілення

полінуклеотид, що містить екзогенну послідовність, щоб бути вставленим у сайт множинної інсерції, буде містити в собі один або більше регіонів гомології з полінуклеотидом сайту множинної інсерції і/або оточуючого геному для полегшення гомологічної рекомбінації. Приблизно 25, 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500, 2000 або більше нуклеотидів гомології послідовності між донорною і геномною послідовністю (або будь-які цілі значення від 10 до 2000 нуклеотидів, або більше) будуть підтримувати гомологічну рекомбінацію між ними. У деяких варіантах втілення гомологічні плечі містять менше ніж 1000 пар основ у довжину. В інших варіантах втілення гомологічні плечі містять менше ніж 750 пар основ у довжину. Див. також попередню заявку на патент США № 61/124047, яка включена в даний документ як посилання.

Молекули донора (екзогенна послідовність) можуть містити кілька переривчастих регіонів гомології із клітинним хроматином. Наприклад, для цільової інсерції послідовностей, які звичайно не присутні в регіоні інтересу, вищезгадані послідовності можуть бути представлені в донорній молекулі нуклеїнової кислоти і оточені регіонами гомології з послідовністю гена в регіоні інтересу.

[00130] Будь-яка послідовність інтересу (екзогенна послідовність) може бути введена в сайт множинної інсерції або видалена з нього, як описано тут. Типові екзогенні послідовності включають, не обмежуючись цим, будь-яку поліпептидну кодуєчу послідовність (наприклад, кДНК), промотор, енхансер і інші регуляторні послідовності (наприклад, інтерферуючі РНК-послідовності, мшРНК-касети експресії, епітопні мітки, маркерні гени, сайти розпізнавання ферментів розщеплення і різні види конструкцій експресії. Такі послідовності можуть бути легко отримані за допомогою стандартних молекулярно-біологічних способів (клонування, синтез і т.д.) і/або є комерційно доступними. Екзогенна послідовність може бути введена в клітину перед експресією гібридного білка (гібридних білків), одночасно з нею або після.

[00131] Донорний полінуклеотид може бути ДНК або РНК, одноланцюговим або дволанцюговим і може бути введений у клітину в лінійній або круговій формі. Якщо він введений у лінійній формі, кінці донорної послідовності можуть бути захищені (наприклад, від екзонуклеолітичної деградації) за допомогою способів, відомих фахівцям у даній галузі техніки. Наприклад, один або більше залишків дідезоксинуклеотиду додають до кінця 3' лінійної молекули і/або самокомплементарні олігонуклеотиди лігують з одним або з обома кінцями. Див., наприклад, роботи Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889. Додаткові способи захисту екзогенних полінуклеотидів від деградації включають, не обмежуючись цим, додавання кінцевої групи (груп) і використання модифікованих міжнуклеотидних зв'язків, таких як, наприклад, фосфоротіоати, фосфороамідати і залишки О-метил-рибози або дезоксирибози

[00132] Полінуклеотид може бути введений у клітину як частина векторної молекули, що має додаткові послідовності, такі як, наприклад, джерела реплікації, промотори і гени, що кодуєть резистентність до антибіотиків. Крім того, донорні полінуклеотиди можуть бути введені як гола нуклеїнова кислота, як нуклеїнова кислота в комплексі з речовиною, таким як наночастинка, ліпосома або поллоксамер, або можуть бути доставлені в рослинні клітини за допомогою бактерій або вірусів (наприклад, *Agrobacterium*, *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, вірусу тютюнової мозаїки, картопляного вірусу X, вірусу мозаїки цвітної капусти і вірусу мозаїки листа маніоки. Див., наприклад, роботу Chung et al. (2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4.

[00133] Як докладно зазначено вище, сайти зв'язування на сайті множинної інсерції для двох гібридних білків (гомодімерів або гетеродімерів), кожний з яких містить зв'язуючий домен цинкового пальця і напівдомен розщеплення, можуть бути розташовані через 5-8 або 15-18 нуклеотидів один від одного, як виміряно від межі кожного сайту зв'язування, найближчої до іншого сайту зв'язування, а розщеплення відбувається між сайтами зв'язування. Не має значення, чи відбувається розщеплення в одному сайті або в декількох сайтах між сайтами зв'язування, тому що розщеплені геномні послідовності замінюються донорними послідовностями. Таким чином, для ефективного змінювання послідовності одиночних нуклеотидних пар за допомогою цільової рекомбінації, центральна точка регіону між сайтами зв'язування знаходиться в межах 10000 нуклеотидів цієї нуклеотидної пари, краще - у межах 1000 нуклеотидів або 500 нуклеотидів, або 200 нуклеотидів, або 100 нуклеотидів, або 50 нуклеотидів, або 20 нуклеотидів, або 10 нуклеотидів, або 5 нуклеотидів, або 2 нуклеотидів, або одного нуклеотиду, або в нуклеотидній парі, що становить інтерес.

[00134] Також надані способи і композиції, які можуть підвищити рівні цільових рекомбінацій, включаючи, але не обмежуючись цим, використання додаткових злиттів ZFP-функціональний домен, щоб активувати експресію генів, які беруть участь у гомологічній рекомбінації, таких як, наприклад, рослинні гени RAD54 групи епістазу (наприклад, AtRad54, AtRad51) і гени, продукти

яких взаємодіють із вищезгаданими генними продуктами. Див., наприклад, роботи Klutstein et al. *Genetics*. 2008 Apr; 178(4):2389-97.

[00135] Аналогічно злиття ZFP-функціональний домен можуть бути використані в комбінації зі способами й композиціями, описаними тут, для пригнічення експресії генів, що беруть участь у негомологічному з'єднанні кінців (наприклад, Ku70/80, XRCC4, полі (ADP рибоза) полімераза, ДНК-лігаза 4). Див., наприклад, роботи Riha et al. (2002) *EMBO* 21:2819-2826; Freisner et al. (2003) *Plant J.* 34:427-440; Chen et al. (1994) *European Journal of Biochemistry* 224:135-142. Способи активації й пригнічення експресії гена за допомогою злиття між зв'язуючим доменом цинкового пальця і функціональним доменом розкриті, наприклад, у патентах США під номерами 6534261, 6824978 і 6933113, що перебувають у спільному володінні. Додаткові способи пригнічення включають використання антизмистовних олігонуклеотидів і/або малих інтерферуючих РНК (міРНК або РНК-і) або мшРНК, націлених на послідовність гена, який повинен бути подавленим.

[00136] Подальше підвищення ефективності цільової рекомбінації в клітинах, що містять молекулу злиття цинковий палець/нуклеаза і донорну ДНК-молекулу, досягається шляхом блокування клітин в G2-фазі клітинного циклу, коли процеси відновлення, що задаються гомологією, максимально активні. Така затримка може бути досягнута різними способами. Наприклад, клітини можуть бути оброблені за допомогою, наприклад, лікарських засобів, сполук і/або малих молекул, які впливають на прогресію клітинного циклу таким чином, щоб затримати клітини в G2-фазі. Типові молекули цього типу включають, не обмежуючись цим, сполуки, які впливають на полімеризацію мікротрубочок (наприклад, вінбластин, нокадазол, таксол), сполуки, які взаємодіють із ДНК (наприклад, цис-платина(II) дихлорид діаміну, цисплатин, доксорубіцин), і/або сполуки, які впливають на синтез ДНК (наприклад, тимідин, гідроксисечовина, L-мімозин, етопозид, 5-фторурацил). Додаткове збільшення ефективності рекомбінації досягається за рахунок використання інгібіторів гістондеацетилази (ГДАЦ) (наприклад, бутирату натрію, трихостатину А), які змінюють структуру хроматину, щоб зробити геномну ДНК більш доступною для клітинних механізмів рекомбінації.

[00137] Додаткові способи затримки клітинного циклу включають надмірну експресію білків, які інгібують активність ЦЗК (циклінзалежних кіназ) клітинного циклу, наприклад, шляхом введення кДНК, що кодує білок у клітині, або шляхом введення в клітину інженерного ZFP, який активує експресію гена, що кодує білок. Затримка клітинного циклу також досягається за рахунок інгібування активності циклінів і ЦЗК, наприклад, за допомогою РНК-і способів (наприклад, патент США № 6506559) або шляхом введення в клітини інженерного ZFP, який пригнічує експресію одного або більше генів, залучених у прогресію клітинного циклу, таких як, наприклад, циклін і/або ЦЗК гени. Див., наприклад патент США № 6534261, що перебуває в спільному володінні, для способів синтезу інженерних білків типу "цинковий палець" для регуляції експресії генів.

[00138] Альтернативно в певних випадках цільове розщеплення проводиться за відсутності донорного полінуклеотиду (краще у фазі S і G2), а рекомбінація відбувається між гомологічними хромосомами.

Вектори експресії

[00139] Нуклеїнова кислота, що кодує один або більше гібридних білків (наприклад, ZFN), як описано тут, може бути клонована у вектор для трансформації в прокаріотичні або еукаріотичні клітини для реплікації і/або експресії. Вектори можуть являти собою прокаріотичні вектори, наприклад, плазміди, або "човникові" вектори, вектори комах або еукаріотичні вектори. Нуклеїнова кислота, що кодує гібридний білок, може також бути клонована у вектор експресії для введення в клітину.

[00140] Щоб експресувати гібридні білки (наприклад, ZFN), послідовності, що кодують гібридні білки, як правило, субклонують у вектор експресії, який містить промотор прямої транскрипції. Підходящі бактеріальні й еукаріотичні промотори добре відомі в даній галузі техніки й описані, наприклад, у роботах Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989; 3rd ed., 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); і *Current Protocols in Molecular Biology* Ausubel et al., supra). Системи бактеріальної експресії для експресії ZFP є доступними, наприклад, в *E. coli*, *Bacillus* sp. і *Salmonella* (Palva et al., *Gene* 22:229-235 (1983)). Набори для таких систем експресії є комерційно доступними. Системи еукаріотичної експресії для клітин ссавців, дріжджів і клітин комах добре відомі фахівцям у даній галузі техніки й також є комерційно доступними.

[00141] Промотор, використовуваний для прямої експресії, що кодує гібридний білок нуклеїнової кислоти, залежить від конкретного застосування. Наприклад, сильний конститутивний промотор, що підходить клітині-хазяїнові, як правило, використовується для

експресії й очищення гібридних білків.

[00142] На відміну від цього, коли гібридний білок вводиться *in vivo* для регулювання генів рослин (див. розділ "Доставка нуклеїнових кислот у рослинні клітини", нижче), використовується або конститутивний, регульований (наприклад, під час розвитку, за допомогою типу тканин або клітин або за допомогою навколишнього середовища), або індукцйбельний промотор, залежно від конкретного використання гібридного білка. Необмежуючі приклади рослинних промоторів включають промоторні послідовності, отримані від *A. thaliana* убіквітину-3 (убі-3) ((Callis, et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:12486-12493), *A. tumefaciens* маннопин сінтази (Δmas) (Petolino et al., патент США № 6730824) і/або вірусу мозаїки листа маніоки (CsVMV) (Verdaguer et al., 1996, Plant Molecular Biology 31:1129-1139). Див. також розділ Приклади.

[00143] На додаток до промотора, вектор експресії звичайно містить одиницю транскрипції або касету експресії, яка містить всі додаткові елементи, необхідні для експресії нуклеїнової кислоти в клітинах-хазяївах, прокаріотичних або еукаріотичних. Типова касета експресії, таким чином, містить промотор, функціонально зв'язаний, наприклад, з послідовностями нуклеїнових кислот, що кодують гібридний білок, і сигнали, необхідні, наприклад, для ефективного поліаденілування транскрипту, закінчення транскрипції, сайтів зв'язування рибосом або закінчення трансляції. Додаткові елементи касети можуть включати, наприклад, енхансери, гетерологічні сигнали сплайсингу і/або сигнал ядерної локалізації (СЯЛ).

[00144] Конкретний вектор експресії, використовуваний для транспортування генетичної інформації в клітину, вибирають у зв'язку з передбачуванним використанням гібридних білків, наприклад, експресія в рослинах, тваринах, бактеріях, грибах, найпростіших і т.д. (див. вектори експресії, описані нижче). Стандартні бактеріальні й тваринні вектори експресії відомі в даній галузі техніки і докладно описані, наприклад, у патентній публікації США 20050064474A1 і в міжнародних патентних публікаціях під номерами WO05/084190, WO05/014791 і WO03/080809.

[00145] Стандартні способи трансфекції можуть бути використані для виробництва клітинних ліній бактеріальних, ссавців, дріжджових або комах, які експресують велику кількість білка, який може бути очищений за допомогою стандартних способів (див., наприклад, роботи Colley et al., J. Biol. Chem. 264:17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). Трансформація еукаріотичних і прокаріотичних клітин проводиться згідно стандартних способів (див., наприклад, Morrison, J. Bact. 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362 (Wu et al., eds., 1983)).

[00146] Для введення сторонніх нуклеотидних послідовностей у такі клітини-хазяїва може бути використана будь-яка з добре відомих процедур. Такі процедури включають використання трансфекції кальцію фосфату, полібрену, злиття протопластів, електропорації, ультразвукових способів (наприклад, сонопорації), ліпосом, мікроін'єкцій, голих ДНК, плазмідних векторів, вірусних векторів, як епісомних, так і інтегративних, і будь-яких інших добре відомих способів для введення клонованої геномної ДНК, кДНК, синтетичної ДНК або іншого стороннього генетичного матеріалу в клітину-хазяїна (див., наприклад, роботу Sambrook et al., вище). Необхідно тільки, щоб конкретні використовувані генно-інженерні процедури були здатні успішно впроваджувати щонайменше один ген у клітину-хазяїна, здатну експресувати білок вибору.

Доставка нуклеїнових кислот у рослинні клітини

[00147] Як відзначалося вище, ДНК-конструкції можуть бути введені в бажану рослину-хазяїна (наприклад, у геном) за допомогою різних традиційних способів. Для розгляду таких способів див., наприклад, роботи Weissbach & Weissbach Methods for Plant Molecular Biology (1988, Academic Press, N.Y.) Section VIII, pp. 421- 463; і Grierson & Corey, Plant Molecular Biology (1988, 2d Ed.), Blackie, London, Ch. 7- 9.

[00148] Наприклад, ДНК-конструкція може бути введена безпосередньо в геномну ДНК рослинної клітини з використанням таких способів, як електропорація і мікроін'єкція протопластів рослинної клітини, або ДНК-конструкції можуть бути введені безпосередньо в тканини рослини з використанням балістичних способів, таких як бомбардування ДНК-частинками (див., наприклад, роботу Klein et al. (1987) Nature 327:70- 73). Альтернативно ДНК-конструкція може бути введена в рослинну клітину за допомогою трансформації наночастинок (див., наприклад, заявку на патент США № 12/245685, яка включена в даний документ як посилання у всій своїй повноті). Альтернативно ДНК-конструкції можуть бути об'єднані з відповідними Т-ДНК граничними/фланговими регіонами і введені у звичайний *Agrobacterium tumefaciens* вектор хазяїна. Способи *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації, що включають нейтралізацію і використання бінарних векторів, добре описані в науковій літературі. Див., наприклад, роботи Horsch et al. (1984) Science 233:496- 498 і Fraley et al. (1983) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80:4803.

[00149] Крім того, трансфер генів може здійснюватися з використанням вірусів або бактерій не-Agrobacterium, таких як *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, картопляний вірус X, вірус мозаїки цвітної капусти і вірус мозаїки листа маніоки і/або вірус тютюнової мозаїки, див., наприклад, роботу Chung et al. (2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4.

[00150] Функції вірулентності *Agrobacterium tumefaciens* хазяїна будуть направляти інсерцію Т-ланцюжка, що містить конструкцію, і суміжний маркер у ДНК рослинної клітини, коли клітина інфікована бактеріями, за допомогою бінарного Т ДНК вектора (Bevan (1984) Nuc. Acid Res. 12:8711- 8721) або процедури спільного культивування (Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231). Як правило, система трансформації *Agrobacterium* використовується для розробки дводольних рослин (Bevan et al. (1982) Ann. Rev. Genet 16:357- 384; Rogers et al. (1986) Methods Enzymol. 118:627- 641). Система трансформації *Agrobacterium* також може використовуватися для трансформації, а також для переносу ДНК в однодольні рослини і рослинні клітини. Див. патент США № 5591616, роботи Hernalsteen et al. (1984) EMBO J 3:3039- 3041; Hooykass- Van Slooter et al. (1984) Nature 311:763- 764; Grimsley et al. (1987) Nature 325:1677- 179; Boulton et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:31- 40; і Gould et al. (1991) Plant Physiol. 95:426- 434.

[00151] Альтернативні способи переносу і трансформації генів включають, не обмежуючись цим, трансформацію протопласта через кальцій-, поліетиленгліколь (ПЕГ)- або опосередковане електропорацією поглинання голої ДНК (див. роботи Paszkowski et al. (1984) EMBO J 3:2717-2722, Potrykus et al. (1985) Molec. Gen. Genet. 199:169- 177; Fromm et al. (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:5824- 5828; і Shimamoto (1989) Nature 338:274- 276), а також електропорацію рослинних тканин (D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4:1495- 1505). Додаткові способи трансформації рослинної клітини включають мікроін'єкції, опосередковане карбідом кремнію ДНК-поглинання (Kaerpler et al. (1990) Plant Cell Reporter 9:415- 418) і бомбардування мікрочастинками (див. Klein et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305- 4309; і Gordon- Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603- 618).

[00152] Розкриті способи і композиції можуть бути використані для вставки екзогенних послідовностей у сайт множинної інсерції, який був вставлений у геном рослинної клітини. Це підходить, тому що експресія введеного трансгена в геном рослини сильно залежить від його сайту інтеграції. Таким чином, гени, що кодують, наприклад, стійкість до гербіцидів, резистентність до комах, поживні речовини, молекули антибіотиків або терапевтичні молекули, можуть бути вставлені за допомогою цільової рекомбінації в регіони геному рослин, сприятливі для їх експресії.

[00153] Трансформовані клітини рослин, які виробляються за допомогою кожного з перерахованих вище способів трансформації, можуть бути культивовані, щоб відновлювати цілу рослину, яка володіє трансформованим генотипом і, таким чином, бажаним фенотипом. Такі способи відновлення покладаються на маніпуляції з певними фітогормонами в живильному середовищі культури тканин, як правило, покладаючись на біоцидний і/або гербіцидний маркер, який був введений разом із заданою нуклеотидною послідовністю. Регенерація рослин з культури протопластів описана в роботах Evans, et al., "Protoplasts Isolation and Culture" in Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124- 176, Macmillan Publishing Company, New York, 1983; and Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21- 73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Регенерація також може бути отримана з рослинного каллюса, експлантів, органів, пилку, ембріонів або їх частин. Такі способи регенерації описані в цілому в роботах Klee et al. (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467- 486.

[00154] Нуклеїнові кислоти, які вводяться в клітини рослини, можуть бути використані для надання бажаних ознак, по суті, будь-якій рослині. Широкий спектр рослин і систем рослинної клітини можуть бути розроблені для заданих фізіологічних і агрономічних характеристик, описаних тут, використовуючи конструкції нуклеїнових кислот даного розкриття і різні способи трансформації, згадані вище. У кращих варіантах втілення цільові рослини і рослинні клітини для генної інженерії включають, не обмежуючись цим, однодольні й дводольні рослини, такі як зернові культури, у тому числі злакові зернові культури (наприклад, пшениця, кукурудза, рис, просо, ячмінь), плодові культури (наприклад, помідор, яблуко, груша, полуниця, апельсин), кормові культури (наприклад, люцерна), культури овочевих коренеплодів (наприклад, морква, картопля, цукровий буряк, батат), листові овочеві культури (наприклад, салат-латук, шпинат); квітучі рослини (наприклад, петунія, троянда, хризантема), хвойні дерева і сосни (наприклад, сосна, ялиця, ялина); рослини, використовувані у фіторемерації (наприклад, рослини, що накопичують важкі метали); олійні культури (наприклад, соняшник, насіння рапсу), а також рослини, використовувані в експериментальних цілях (наприклад, Арабідопсис). Таким чином, розкриті способи й композиції можуть використовуватися для більш широкого кола рослин, у тому числі, але не обмежуючись цим, для видів з роду *Asparagus*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*,

Citrullus, Capsicum, Cucurbita, Daucus, Erigeron, Glycine, Gossypium, Hordeum, Lactuca, Lolium, Lycopersicon, Malus, Manihot, Nicotiana, Orychophragmus, Oryza, Persea, Phaseolus, Pisum, Pyrus, Prunus, Raphanus, Secale, Solanum, Sorghum, Triticum, Vitis, Vigna і Zea

5 [00155] Фахівцям в даній галузі техніки буде зрозуміло, що після того, як екзогенна послідовність стабільно включена в трансгенні рослини і підтверджена її функціональність, вона може бути введена в інші рослини за допомогою статевого схрещування. Будь-який із ряду стандартних способів розмноження може бути використаний залежно від видів, які підлягають схрещуванню.

10 [00156] Трансформована рослинна клітина, каллюс, тканина або рослина можуть бути ідентифіковані й ізольовані за допомогою селекції або скринінга генно-інженерного рослинного матеріалу для ознак, які кодуються маркерними генами, що присутні в трансформуючій ДНК. Наприклад, селекція може бути виконана шляхом вирощування інженерного рослинного матеріалу на середовищах, що містять інгібуючу кількість антибіотиків або гербіцидів, яким трансформуюча генна конструкція, надає резистентність. Крім того, трансформовані рослини і
15 рослинні клітини також можуть бути ідентифіковані шляхом скринінгу на види активності будь-яких видимих маркерних генів (наприклад, β -глюкуронідази, люциферази, B або C1 генів), які можуть бути присутніми на рекомбінантних конструкціях нуклеїнових кислот. Такі методології селекції і скринінгу є добре відомими фахівцям у даній галузі техніки.

20 [00157] Фізичні й біохімічні способи також можуть бути використані для ідентифікації трансформантів рослини або рослинної клітини, що містять вставлені конструкції гена. Ці способи включають, але не обмежуються цим: 1) Саузерн-аналіз або ПЛР-ампліфікацію для виявлення і визначення структури вставки рекомбінантної ДНК; 2) Норзерн-блот, захист S1 РНази, подовження праймера або зворотну транскриптаза-ПЛР- ампліфікацію для виявлення і вивчення РНК-транскриптів генних конструкцій; 3) ферментативні аналізи для виявлення
25 ферментної або рибозимної активності, якщо такі генні продукти кодуються генною конструкцією; 4) електрофорез білків у гелі, способи Вестерн-блота, імунопреципітацію або фермент-зв'язані імуноферментні аналізи (ІФА), де продуктами генної конструкції є білки. Додаткові способи, такі як гібридизація *in situ*, ферментне забарвлювання й імунозабарвлювання, також можуть бути використані для виявлення наявності або експресії
30 рекомбінантної конструкції в певних органах і тканинах рослин. Способи для проведення всіх цих аналізів добре відомі фахівцям у даній галузі техніки.

[00158] Ефекти генної маніпуляції з використанням способів, описаних тут, можна спостерігати, наприклад, за допомогою Норзерн-блота РНК (наприклад, мРНК), виділеної із тканин, що становлять інтерес. Як правило, якщо мРНК є присутньою, або кількість мРНК
35 збільшилась, можна припустити, що в цей час експресуються відповідні трансгени. Можуть бути використані й інші способи вимірювання активності генів і/або закодованих поліпептидів. Різні типи ферментативних аналізів можуть бути використані залежно від використовуваного субстрату і способу виявлення збільшення або зменшення продукту реакції або побічного продукту. Крім того, рівні експресованого поліпептиду можуть бути виміряні імунохімічним
40 способом, тобто за допомогою ELISA, RIA, EIA і інших аналізів на основі антитіл, добре відомих фахівцям у цій галузі техніки, наприклад, шляхом аналізів електрофоретичного виявлення (або з забарвлюванням, або за допомогою Вестерн-блота). У якості необмежуючого прикладу, виявлення ААД-1 і ФАТ білків з використанням аналізу ІФА описано в заявці на патент США № 11/587893, який включений у даний документ як посилання в повному обсязі. Трансген може
45 бути селективно експресований у деяких тканинах рослини або на деяких стадіях розвитку або трансген може бути експресований практично у всіх тканинах рослини в значній мірі протягом всього її життєвого циклу. Проте, будь-який режим комбінаторної експресії також застосовний.

[00159] Дане розкриття також містить у собі насіння трансгенних рослин, описаних вище, де насіння має трансгенну або генну конструкцію. Дане розкриття додатково охоплює потомство,
50 клони, клітинні лінії або клітини трансгенних рослин, описаних вище, де зазначене потомство, клон, клітинна лінія або клітина мають трансгенну або генну конструкцію.

[00160] Гібридні білки (наприклад, ZFN) і вектори експресії, що кодують гібридні білки, можуть бути введені безпосередньо в рослину для генної регуляції, цільового розщеплення і/або рекомбінації. У деяких варіантах втілення рослина містить безліч паралогічних генів-мішеней. Таким чином, один або більше різних гібридних білків або векторів експресії, що
55 кодують гібридні білки, можуть бути введені в рослини з метою виявлення одного або більше із цих паралогічних генів (наприклад, Zp15, див. РСТ патентну публікацію WO2010077319) генів у рослині.

[00161] Введення ефективних кількостей здійснюється за допомогою кожного зі шляхів
60 введення, звичайно використовуваних для введення гібридних білків в остаточний контакт із

рослинною клітиною, що підлягає обробці. ZFP вводять будь-яким підходящим способом, краще - із прийнятними носіями. Підходящі способи введення таких модуляторів доступні й добре відомі фахівцям у цій галузі техніки і, незважаючи на те, що для введення певної композиції може бути використаний більше ніж один шлях, конкретний шлях може часто забезпечити більш швидку й більш ефективну реакцію, ніж інший шлях введення.

[00162] Носії можуть бути також використані й частково обумовлюються конкретною композицією, яка вводиться, а також конкретним способом, який використовується для введення композиції. Таким чином, існує широка різноманітність підходящих форм носіїв, які є комерційно доступними.

Доставка в клітини ссавців

[00163] ZFN, описані тут, можуть бути доставлені в цільові клітини ссавця за допомогою будь-якого придатого засобу, у тому числі, наприклад, шляхом ін'єкції ZFN мРНК. Див. роботу Hammerschmidt et al. (1999) *Methods Cell Biol.* 59:87-115.

[00164] Способи доставки білків, що містять цинкові пальці, описані, наприклад, у патентах США під номерами 6453242, 6503717, 6534261, 6599692, 6607882, 6689558, 6824978, 6933113, 6979539, 7013219 і 7163824, розкриття всіх з яких включені в даний документ як посилання у всій їх повноті.

[00165] Як описано тут, ZFN можуть бути доставлені з використанням векторів, що містять послідовності, які кодують один або більше із ZFN. Будь-які векторні системи можуть бути використані, у тому числі, але не обмежуючись цим, плазмідні вектори, ретровірусні вектори, лентівірусні вектори, аденовірусні вектори, поксвірусні вектори, вектори вірусу герпесу і адено-зв'язаного вірусу вектори, і т.д. Див. також патенти США під номерами 6534261, 6607882, 6824978, 6933113, 6979539, 7013219 і 7163824, включені в даний документ у якості посилання у всій їх повноті. Більше того, буде очевидно, що будь-який із цих векторів може включати одну або більше ZFN-кодуючих послідовностей. Таким чином, коли одна або більше пар ZFN вводяться в клітину, ZFN може переноситися на тому самому векторі або на різних векторах. Коли використовується велика кількість векторів, кожен вектор може містити послідовність, що кодує одну або велику кількість ZFN.

[00166] Звичайні способи на основі вірусного і невірусного переносу генів можуть бути використані для введення нуклеїнових кислот, що кодують генно-інженерні ZFP, у клітини ссавців. Такі способи можуть бути використані для введення нуклеїнових кислот, що кодують ZFP, у клітини ссавців *in vitro*. У деяких варіантах втілення нуклеїнові кислоти, що кодують ZFP, вводять для використання *in vivo* або *ex vivo*.

[00167] Невірусні системи доставки вектора включають електропорацію, ліпофекцію, мікроін'єкцію, балістику, віросоми, ліпосоми, імуноліпосоми, полікатіон або кон'югати ліпід:нуклеїнова кислота, голу ДНК, штучні віріони і агент, що збільшує використання ДНК. Використання сонопорації, наприклад, системи Sonitron 2000 (Rich-Map), також може застосовуватися для доставки нуклеїнових кислот. Вірусні системи доставки вектора включають ДНК і РНК віруси, які мають або епісомні, або інтегровані геноми після доставки в клітину. Додаткові типові системи доставки нуклеїнових кислот включають ті, які надані компанією Amaxa Biosystems (Cologne, Germany, Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) і Copernicus Therapeutics Inc, (див., наприклад, патент США US 6008336). Ліпофекція описана, наприклад, у патентах США US 5049386, US 4946787 і US 4897355), а реагенти ліпофекції доступні на комерційній основі (наприклад, Transfectam™ і Lipofectin™). Катіонні й нейтральні ліпіди, які є підходящими для ефективного рецептор-розпізнавання ліпофекції полінуклеотидів, включають такі з Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024. Доставка може здійснюватися в клітини (введення *ex vivo*) або тканини-мішені (введення *in vivo*). Підготовка комплексів ліпід:нуклеїнова кислота, включаючи цільові ліпосоми, такі як імуноліпідні комплекси, добре відомі фахівцям у даній галузі техніки (див., наприклад, Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao et al., *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad et al., *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992); патенти США під номерами 4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028 і 4946787).

[00168] Як відзначалося вище, розкриті способи й композиції можуть бути використані в будь-якому типі клітини ссавця. Білки (наприклад, ZFP), полінуклеотиди, що їх кодують, і композиції, що містять білки і/або полінуклеотиди, описані тут, можуть бути доставлені в клітини-мішені за допомогою будь-якого придатного засобу. Придатні клітини включають, не обмежуючись цим, еукаріотичні й прокаріотичні клітини, і/або клітинні лінії. Необмежуючі приклади таких клітин або клітинних ліній, отриманих від таких клітин, включають COS, CHO

(наприклад, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (наприклад, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T) і perC6 клітини, а також клітини комах, такі як *Spodoptera fugiperda* (Sf), або грибові клітини, такі як *Saccharomyces*, *Pichia* і *Schizosaccharomyces*. У деяких варіантах втілення клітинна лінія являє собою CHO-K1, MDCK або HEK293 клітинну лінію. Придатні первинні клітини включають мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і інші підмножини клітин крові, такі як, але не обмежуючись цим, CD4+ Т-клітини і CD8 + Т-клітини. Придатні клітини також включають стовбурові клітини, такі як, наприклад, ембріональні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, гемопоетичні стовбурові клітини, нервові стовбурові клітини і мезенхимальні стовбурові клітини.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Конструювання плазмід

Приклад 1.1: eZFN сайти зв'язування

[00169] Вісім розроблених сайтів зв'язування нуклеази цинкового пальця (eZFN) (CL:AR – SEQ ID NO:1, RL:PR – SEQ ID NO:2, AL:PR – SEQ ID NO:3, PL:AR – SEQ ID NO:4, CL:RR – SEQ ID NO:5, RL:CR – SEQ ID NO:6, CL:PR – SEQ ID NO:7, RL:AR – SEQ ID NO:8) були об'єднані в єдиний фрагмент ДНК (мульти-eZFN сайт зв'язування) з розташованими з боків сайтами ПЛР-праймера, унікальними для кожного із сайту зв'язування eZFN. Крім того, інші eZFN сайти зв'язування були сконструйовані й продемонстрували розщеплення на високому рівні в дріжджах (див., наприклад, патентну публікацію США № 2009/0111119), включаючи: PL:RR – SEQ ID NO:9, AL:RR – SEQ ID NO:10, AL:CR – SEQ ID NO:11, PL:CR – SEQ ID NO:12 і гомодімер eZFN RR:RR – SEQ ID NO:13, RL:RL – SEQ ID NO:14, PR:PR – SEQ ID NO:15, PL:PL – SEQ ID NO:16, CL:CL – SEQ ID NO:17, CR:CR – SEQ ID NO:18, AR:AR – SEQ ID NO:19 і AL:AL – SEQ ID NO:20. Позначення "CL" і "CR" належать, відповідно, до "лівої" і "правої" сторін конструкцій цинкового пальця для рецептора CCR5, позначених як 8266 і 8196, які мають послідовності й зв'язуються із цільовими сайтами, показаними в патентній публікації США № 2008/0159996. Позначення "AL" і "AR" належать, відповідно, до "лівої" і "правої" сторін конструкцій цинкового пальця для локусу AAVS1, позначених як 15556 і 15590, і мають послідовності спіралі розпізнавання і зв'язуються із цільовими сайтами, показаними в патентній публікації США № 2008/0299580. Послідовності спіралі розпізнавання і цільові сайти для "PL" і "PR" конструкцій, а також для "RL" і "RR" конструкцій перелічені нижче в таблицях 1 і 2. "PL" і "PR" обидва належать до "лівої" і "правої" сторін конструкцій цинкового пальця для ZFN, специфічних для гена людини PRMT1, у той час як "RL" і "RR" належать до "лівої" і "правої" сторін конструкцій цинкового пальця для ZFN, специфічних для мишачого локусу Rosa26.

[00170] Жоден із цих цільових сайтів не присутній у геномі кукурудзи, як виміряно за допомогою біоінформаційного аналізу. Сайти ПЛР-праймера були включені для оцінки NHEJ, отриманого в результаті дволанцюгового розщеплення хромосомно-локалізованого ДНК-фрагмента за допомогою eZFN.

Таблиця 1:

Конструкції ZFN

ZFN назва (ген)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
ZFN 19353 (PRMT) "PL»	DRSNLSR (SEQ ID NO:27)	RSDALTQ (SEQ ID NO:28)	TSGNLTR (SEQ ID NO:29)	TSGSLTR (SEQ ID NO:30)	TSGHLSR (SEQ ID NO:31)	не доступно
ZFN 19354 (PRMT) "PR»	RSANLSV (SEQ ID NO:32)	DRANLSR (SEQ ID NO:33)	RSDNLRE (SEQ ID NO:34)	ERGTLAR (SEQ ID NO:35)	TSSNRKT (SEQ ID NO:36)	не доступно
ZFN 18473 (mRosa26) "RL»	DRSARTR (SEQ ID NO:37)	QSGHLSR (SEQ ID NO:38)	RSDDLK (SEQ ID NO:39)	RNDHRKN (SEQ ID NO:40)	не доступно	не доступно
ZFN 18477 (mRosa26) "RR»	QSGDLTR (SEQ ID NO:41)	TSGSLTR (SEQ ID NO:42)	QSGHLAR (SEQ ID NO:43)	QSSDLTR (SEQ ID NO:44)	RSDNLSE (SEQ ID NO:45)	QNAHRKT (SEQ ID NO:46)

Таблиця 2:

Цільові сайти зв'язування ZFN

ZFN назва (ген)	Цільовий сайт зв'язування
ZFN 19353 (PRMT) "PL»	acGGTGTGAGcATGGACtcgtagaaga (SEQ ID NO:47)
ZFN 19354 (PRMT) "PR»	tcTATGCCCGGGACAAGtggtggtgag (SEQ ID NO:48)
ZFN 18473 (mRosa26) "RL»	gaTGGGCGGGAGTCttctgggcaggctt (SEQ ID NO:49)
ZFN 18477 (mRosa26) "RR»	ctAGAAAGACTGGAGTTGCAgatcacga (SEQ ID NO:50)

[00171] Всі сайти були включені в синтезований фрагмент ДНК, і фрагмент клонували в плазміді з використанням ТОРО-Клонування (Invitrogen, Carlsbad, CA). Реакція Gateway LR CLONASE™ (Invitrogen) була використана для переносу цього фрагмента у вектори pDAB101834 і pDAB101849. Ці вектори містять селективні маркери, що підходять для тютюну й кукурудзи, відповідно. pDAB101834 складається із промотора вірусу мозаїки листа маніюки (CsmMV; промотор і 5' нетрансльований регіон, отримані з вірусу мозаїки листа маніюки; Verdaguer et al., (1996) Plant Molecular Biology, 31(6) 1129-1139), гена фосфінотрицин ацетил трансферази (ФАТ, Wohleben et al., (1988) Gene 70(1), 25-37) і AtuORF1 3' UTR (3' нетрансльованого регіону (UTR, HTP) що містить термінатор транскрипції, і сайт поліаденілування відкритої рамки зчитування 1 (ORF1) з Agrobacterium tumefaciens pT15955; Barker et al., (1983) Plant Molecular Biology, 2(6), 335-50). Вектор pDAB101849 кукурудзи містить касету селективного маркера, що включає промотор гена актин 1 рису (OsAct1, промотор, 5' нетрансльований регіон (UTR) і інтрон, отримані з гена актин 1 рису Oryza sativa (Act1), McElroy et al., (1990) Plant Cell 2(2):163-71) і ZmLip 3' UTR (3' нетрансльований регіон (UTR), що містить термінатор транскрипції і сайт поліаденілування LIP гена кукурудзи Zea mays, Genbank номер доступу L35913).

[00172] Результуючий вектор тютюну, pDAB105900 (Фігура 7), був перенесений в Agrobacterium tumefaciens, використовуючи електропорацію. Після валідації ферменту рестрикції, Agrobacterium зберігався як гліцерінова сировина до використання. Кукурудзяний вектор, pDAB105908 (Фігура 8), складали і очищували, використовуючи набір Qiagen QIAfilter Plasmid Giga (Qiagen, Valencia, CA) відповідно до протоколу виробника.

Приклад 1.2: Вектори для експресування eZFN

[00173] ZFN-вектори, які експресують відповідні спіралі розпізнавання або в канонічному (C₂H₂), або в неканонічному (C₃H) кістязку були виготовлені, по суті, так, як описано в патентних публікаціях США під номерами 2008/0182332 і 2008/0159996.

[00174] Функція ZFN була протестована на eZFN сайті множинної інсерції, як описано в Прикладі 1.1, вставленому в скринінгову систему ZFN дріжджів (див. патентну публікацію США № 2009/0111119). Всі протестовані ZFN-пари були активними в дріжджовій системі.

[00175] Вісім eZFN, клоновані у вектори, які містять регуляторні послідовності, необхідні для експресії в клітинах рослин. Стратегії клонування, розгорнуті для конструкцій, є, по суті, такими, як описані в патентних публікаціях США під номерами 2009/0111188A1 і 20100199389. Фігури 9 і 10 демонструють схематично узагальнені касети експресії eZFN.

Приклад 2: Оцінювання eZFN у кукурудзі

Приклад 2.1: Whiskers™-опосередкована ДНК-доставка

[00176] Ембріогенні клітинні культури кукурудзи Hi-II були вироблені й були використані в якості джерела живих рослинних клітин, на яких була продемонстрована інтеграція. Фахівець у даній галузі техніки може передбачити використання культур клітин, отриманих з різних видів рослин, або диференційованих тканин рослинного походження з різних видів рослин як джерела живих рослинних клітин, у яких була продемонстрована інтеграція.

[00177] У цьому прикладі плазміді (pDAB105908), що містить касету ФАТ рослинного селективного маркера і мульти-eZFN інсерційну послідовність сайту зв'язування,

використовується для генерування трансгенних подій. Трансгенні ізоляти були трансформовані з eZFN для того, щоб оцінити розщеплення подвійного ланцюга.

[00178] Зокрема, 12 мл об'єму глобулярної маси (ОГМ) з раніше кріозбереженої клітинної лінії плюс 28 мл кондиціонованого середовища субкультивують в 80 мл GN6 рідкого середовища (N6 середовище (Chu et al. (1975) *Scientia Sin* 18:659-668), 2,0 мг/л, 2,4-D, 30 г/л сахарози, pH 5,8) у колбі Ерленмейєра об'ємом 500 мл і поміщають на шейкер при швидкості 125 оборотів за хвилину при температурі 28 °C. Цей крок повторюють 2 рази, використовуючи ті ж клітинні лінії, так, що в цілому 36 мл ОГМ розподіляють в 3 колбах. Через 24 години рідке середовище GN6 видаляють і заміняють на 72 мл GN6 S/M осмотичного середовища (N6 середовище, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 45,5 г/л сорбіту, 45,5 г/л манніту, 100 мг/л міо-інозиту, рівень pH 6,0). Колбу інкубують у темряві протягом 30-35 хвилин при температурі 28 °C з помірною швидкістю перемішування (125 оборотів/хвилину). Під час інкубації 50 мг/мл суспензії ниткоподібних кристалів карбіду кремнію (Advanced Composite Materials, LLC, Greer, SC) отримують шляхом додавання 8,1 мл GN6 S/M рідкого середовища до 405 мг стерильних ниткоподібних кристалів карбіду кремнію.

[00179] Після інкубування в GN6 S/M осмотичному середовищі, вміст кожної колби збирають у центрифужну посудину об'ємом 250 мл. Після того як всі клітини в колбі осідають на дно, надлишковий об'ємний вміст, який приблизно дорівнює 14 мл GN6 S/M рідини, відбирають і збирають у стерильну колбу об'ємом 1 літр для подальшого використання. Попередньо зволожену суспензію ниткоподібних кристалів змішують на максимальній швидкості на вихровій мішалці протягом 60 секунд, а потім додають у центрифужну посудину.

[00180] У цьому прикладі 170 мкг очищеного фрагмента із ДНК плазмиди pDAB105908 додають у кожну посудину. Після того як була додана ДНК, посудину негайно поміщають у модифікований комерційний змішувач для фарб Red Devil 5400 (Red Devil Equipment Co., Plymouth, MN) і перемішують протягом 10 секунд. Після перемішування коктейль клітин, середовище, ниткоподібні кристали і ДНК додають до вмісту колби об'ємом 1 літр разом з 125 мл свіжого рідкого середовища GN6 для зниження осмотичності. Клітинам надають можливість відновлення на шейкері при швидкості 125 оборотів/хвилину протягом 2 годин. Шість мілілітрів диспергованої суспензії фільтрують на фільтрувальному папері Whatman № 4 (5,5 см), використовуючи скляний пристрій, що збирає клітини, пов'язаний із власною вакуумною лінією, так, що одержують 60 фільтрів на посудину. Фільтри розміщують на планшетах 60 × 20 мм із твердим середовищем GN6 (таким же, як рідке середовище GN6, за винятком 2,5 г/л гелеутворювача Gelrite) і культивують при температурі 28°C у темряві протягом 1 тижня.

Приклад 2.2: Ідентифікація й ізоляція передбачуваних трансгенних подій

[00181] Через один тиждень після доставки ДНК, фільтрувальний папір переносять на планшети 60 × 20 мм із селективним середовищем GN6 (1H) (N6 середовище, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 100 мг/л міо-інозиту, 2,5 г/л Gelrite, рівень pH 5,8), що містить селективну речовину. Ці селективні планшети інкубують при температурі 28°C протягом одного тижня в темряві. Після одного тижня селекції в темряві тканину вкладають у свіже середовище за допомогою зішкребу половини клітин з кожного планшета в пробірку, що містить 3,0 мл агарозного середовища GN6, яке зберігається при температурі 37-38 °C (N6 середовище, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 100 мг/л міо-інозиту, 7 г/л SeaPlaque агарози, рівень pH 5,8, автоклавована всього лише протягом 10 хвилин при температурі 121 °C).

[00182] Суміш агароза/тканина розбивають за допомогою шпателя, а потім 3 мл суміші агароза/тканина рівномірно виливають на поверхню 100 × 15 мм чашки Петрі, що містить середовище GN6 (1H). Цей процес повторюється для обох половин кожного планшета. Після того як всі тканини залиті, планшети індивідуально запечатують із NESCOFILM® або PARAFILM M® і культивують при температурі 28°C у темних умовах протягом періоду часу до 10 тижнів.

[00183] Передбачувано трансформовані ізоляти, які ростуть у цих селекційних умовах, видаляють із залитих планшетів і переносять у свіже селективне середовище на планшети 60 × 20 мм. Якщо стійкий ріст стає очевидним після приблизно 2 тижнів, подія вважається стійкою до застосовуваних гербіцидів (селективний агент), і аліквоту клітин згодом збирають для аналізу генотипу.

Приклад 2.3: Екстракція геномної ДНК

[00184] Геномну ДНК (гДНК) отримують із ізольованих клітин кукурудзи, як описано в Прикладі 2.2, і використовують у якості шаблону для експериментів ПЛР-генотипування. гДНК отримують приблизно із 100-300 мкл об'єму глобулярної маси (ОГМ) Hi-II каллюса, який був ізольований, як описано вище, відповідно до протоколів виробників, які докладно описані в наборі DNeasy 96 Plant Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA). Геномну ДНК елюють в 100 мкл, елюючого буфера, який поставляється в наборі, що дає остаточну концентрацію 20-200

нг/мкл, а потім аналізують за допомогою способів генотипування на основі ПЛР, описаних нижче.

Приклад 2.4: Молекулярний аналіз кількості копій

[00185] Аналізи TAQMAN® проводять для скринінгу зразків стійкого до гербіцидів каллюса для виявлення тих, які містять єдину копію інтеграції рDAB105908 трансгена. Детальний аналіз проводять із використанням праймерів і зондів, специфічних для касет експресії генів. Події однієї копії ідентифікують для додаткового аналізу.

[00186] Користувальні аналізи TAQMAN® були розроблені для аналізу ФАТ гена в Hi-II каллюсі за допомогою Third Wave Technologies (Madison, WI). Зразки геномної ДНК спочатку денатурують у форматі 96-ямкового планшета шляхом інкубації при температурі 95 °C, а потім охолоджують до кімнатної температури. Далі еталонну суміш (яка містить зондову суміш для ФАТ і внутрішній еталонний ген на додаток до буфера) додають у кожну лунку і зразки покривають мінеральним маслом. Планшети опечатують і інкубують у термоциклері BioRad TETRAD®. Планшети охолоджують до кімнатної температури, перш, ніж зчитувати на флуоресцентному планшетному рідері. Всі планшети містили 1 копію, 2 копії та 4 копії стандартів, а також контрольні зразки дикого типу й контрольні лунки, що не містять зразки. Результати зчитування збирали й порівнювали, в скільки разів вони відрізнялися від нуля (тобто від вихідних даних) для кожного каналу визначали для кожного зразка за допомогою розподілу показника зразка вихідного сигналу на показник відсутності шаблонного вихідного сигналу.

[00187] Із цих даних будують стандартну криву, яка щонайкраще відповідає визначеній за допомогою аналізу лінійній регресії. Використовуючи параметри, визначені із цієї відповідності, для кожного зразка потім розраховується очевидна кількість копій ФАТ.

Приклад 2.5: Дизайн праймера для ПЛР-генотипування

[00188] У цьому прикладі ПЛР-генотипування розуміють як таке, що включає, не обмежуючись цим, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) ампліфікації геномної ДНК, отриманої з ізолюваних тканин каллюса кукурудзи, що прогнозовано містить донорну ДНК, вбудовану в геном, з наступним стандартним клонуванням і секвенуванням продуктів ПЛР-ампліфікації. Способи ПЛР-генотипування були добре описані (наприклад, у роботі Rios, G. et al. (2002) Plant J. 32:243-253) і можуть бути застосовані до геномної ДНК, отриманої від будь-яких видів рослин або з будь-яких типів тканини, включаючи клітинні культури.

[00189] Фахівець у даній галузі техніки може розробити стратегії для ПЛР-генотипування, які включають (але не обмежуються) ампліфікацію специфічних послідовностей у геномі рослини, ампліфікацію множинних специфічних послідовностей у геномі рослини, ампліфікацію неспецифічних послідовностей у геномі рослини або їх комбінацію. За ампліфікацією може йти слідом клонування і секвенування, як описано в цьому прикладі, або пряме секвенування продуктів ампліфікації. Фахівець у даній галузі техніки може передбачити альтернативні способи для аналізу продуктів ампліфікації, сгенерованих тут. В одному з варіантів втілення, описаному тут, у ПЛР-ампліфікації використовуються олігонуклеотидні праймери, специфічні для гена-мішені.

[00190] У прикладах, представлених тут, синтезують олігонуклеотидні праймери, наприклад, за допомогою Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA), в умовах стандартного знеолення й розведення водою до концентрації 100 мкМ. Олігонуклеотидні праймери конструюють для відпалу на флангових регіонах ДНК-вставки. Праймери тестують за допомогою розведення плазмід ДНК у присутності ДНК, ізолюваної з нетрансгенних рослин. рDAB105908 трансгена ампліфікують ПЛР із геномної ДНК передбачуваних подій за допомогою праймерів. Отриманий у результаті фрагмент клонують у плазмиду вектора й секвенують, щоб підтвердити, що мульти-eZFN послідовність сайту зв'язування була повністю інтегрована в геном рослини в процесі трансформації.

Приклад 2.6: Селекція трансгенних подій із цільовою ДНК

[00191] Проводять скринінг подій низьких копій (1-2) за допомогою ПЛР для інтактної мульти-eZFN послідовності сайту зв'язування і ФАТ гена. Кількість копій підтверджують Саузерн аналізом з використанням стандартних способів із зондом ФАТ гена. Каллюс із обраних трансгенних подій, що приховує єдину копію, інтактні вставки зберігають для наступної оцінки з тимчасово експресованими eZFN.

Приклад 3: eZFN ДНК-доставка в клітини рослин

[00192] Для того, щоб надати можливість eZFN-опосередкованого дволанцюгового розщеплення, зрозуміло, що потрібна доставка eZFN-кодуючої ДНК із наступною експресією функціонального eZFN білка в рослинну клітину. Фахівець у даній галузі техніки може передбачити, що експресія функціонального білка ZFN може бути досягнута декількома способами, включаючи, але не обмежуючись цим, трансгенез ZFN-кодуючої конструкції, або

тимчасову експресію ZFN-кодуючої конструкції.

[00193] У прикладах, наведених тут, описуються способи доставки eZFN-кодуючої ДНК у клітини рослин. Фахівець у даній галузі техніки може використовувати будь-який із різних способів доставки ДНК, придатної для рослинних клітин, у тому числі, але не обмежуючись цим, *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію, доставку ДНК на основі балістичних способів або WHISKERS™-опосередковану ДНК-доставку. В одному з варіантів втілення, описаних тут, експерименти балістично-опосередкованої ДНК-доставки проводилися з використанням різних eZFN-кодуючих ДНК-конструкцій.

Приклад 3.1: Балістично-опосередкована доставка ДНК

[00194] Як описано вище, були вироблені ембріогенні Hi-II клітинні культури кукурудзи і вони були використані в якості джерела живих рослин для оцінювання eZFN функції. Фахівець у даній галузі техніки може передбачити використання клітинних культур, отриманих з різних видів рослин або диференційованих тканин рослинного походження з різних видів рослин, у якості джерела живих рослинних клітин, у яких демонструється цільова інтеграція.

[00195] Плазміди, які експресують одну з восьми eZFN, яка зв'язується зі специфічною цільовою послідовністю на мульти-eZFN сайті зв'язування, разом із внутрішнім контролем (IPK-1), піддають бомбардуванню в каллюсному пулі із 5-10 трансгенних ізолятів.

[00196] Події трансгенного Hi-II каллюса кукурудзи субкультивують щотижня в середовищі GN6 (1H). Через сім днів після культивування приблизно 400 мг клітин тонко розподіляють у колі діаметром 2,5 см над центром чашки Петрі 100 × 15 мм, що містить середовище GN6 S/M, затверділе за допомогою 2,5 г/л Gelrite. Клітини культивують у темряві протягом 4 годин. Щоб покрити балістичні частки ДНК, 3 мг золотих часток діаметром 0,6 мікрон промивають один раз 100 % етанолом, двічі - стерильною дистильованою водою і ресуспендують в 50 мкл води в силіконовій пробірці типу Еппендорф. У цілому 5 мкг плазмідної ДНК, 20 мкл спермідину (0,1 М) і 50 мкл хлориду кальцію (2,5 М) додають окремо до суспензії золота і обережно перемішують на вихровій мішалці. Суміш інкубують при кімнатній температурі протягом 10 хв., осаджують при швидкості 10000 оборотів/хвилину в настільній мікроцентрифузі протягом 10 секунд, ресуспендують в 60 мкл холодного 100 % етанолу і 8-9 мкл розподіляють на кожний макроносій.

[00197] Бомбардування виконують із використанням системи Biolistic PDS-1000/HE™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Планшети, що містять клітини, поміщають на середню полицю в умовах Hg вакууму 1100 фунтів на квадратний дюйм і 27 дюймів і піддають бомбардуванню відповідно до оперативного керівництва. Через двадцять чотири години після бомбардування тканини переносять невеликими групами у тверде середовище GN6.

Приклад 4: Секвенування і аналіз Solexa

Приклад 4.1: Підготовка зразків

[00198] Через сімдесят дві години після бомбардування eZFN і контрольним IPK1-ZFN (Shukla et al. (1990) Nature 459, 437-441) тканини збирають у мікроцентрифужні пробірки об'ємом 2 мл і ліофілізують щонайменше протягом 48 годин. Геномну ДНК отримують із ліофілізованої тканини за допомогою набору для отримання гДНК QIAGEN® у відповідності зі специфікацією виробника. Нарешті, ДНК ресуспендують в 200 мкл води і визначають концентрацію за допомогою спектрофотометра Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Цілісність ДНК оцінюють за допомогою потоку всіх зразків через 0,8 % агарозні Е-гелі (Invitrogen, Carlsbad, CA). Всі зразки нормалізують (25 нг/мкл) для ПЛР-ампліфікації, щоб генерувати амплікони для Solexa секвенування.

[00199] ПЛР-праймери для ампліфікації регіонів, що оточують кожний із сайтів eZFN розщеплення, а також IPK1-ZFN цільовий сайт із цільових (ZFN-оброблених) і контрольних зразків були придбані в компанії IDT (Integrated DNA Technologies, San Jose, CA). Оптимальні умови для ампліфікації цих праймерів були ідентифіковані за допомогою градієнтної ПЛР із використанням 0,2 мкМ відповідних праймерів, Accuprime Pfx Supermix (1.1X, Invitrogen, Carlsbad, CA) і 100 нг шаблону геномної ДНК в 23,5 мкл реакції. Циклічні параметри включають початкову денатурацію при температурі 95°C (5 хв.) з наступними 35 циклами денатурації (95°C, 15 с), відпадом [55-72°C, 30 с], екстенсією (68°C, 1 хв.) і остаточною екстенсією (72°C, 7 хв.). Продукти ампліфікації аналізують на 3,5 % TAE агарозних гелях. Після визначення оптимальної температури відпалу проводять препаративні ПЛР-реакції для валідації кожного набору ПЛР-праймерів і для генерування амплікону Solexa. Олігонуклеотиди, використовувані для ампліфікації цільових регіонів eZFN кукурудзи і тютюну наведені в Таблиці 3 нижче. IPK1 регіони націлювання ампліфікують з використанням праймерів (SEQ ID NO: 27 GCAGTGCATGTTATGAGC (прямий праймер) і SEQ ID NO: 28 CAGGACATAAATGAACTGAATC (зворотний праймер)).

Таблиця 3:

Праймерні послідовності, використовувані для ампліфікації сайтів розщеплення eZFN

Назва праймера	Seq ID NO:	Послідовність	Назва праймера	Seq ID NO:	Послідовність
SP/AL:PR	SEQ ID NO:29	GGCACAGAGTAAGAGGAAAA	ASP/AL:PR	SEQ ID NO:38	GCAGTGCTCTGTGGGGTTC
SP/CL:AR	SEQ ID NO:30	AGGGACCCAGGTATACATTT	ASP/CL:AR	SEQ ID NO:39	CCTGGACAGTTGTCAAAATT
SP/CL:PR	SEQ ID NO:31	CATTCCGCCCTTGCCAGC	ASP/CL:PR	SEQ ID NO:40	GTGAACCTATTATCCATCTGTCC
SP/CL:RR	SEQ ID NO:33	GACAATGCCTGACTCCCG	ASP/CL:RR	SEQ ID NO:41	CACTCAGACACCAGGGTTT
SP/PL:AR	SEQ ID NO:34	CAAGGAATGAATGAAACCG	ASP/PL:AR	SEQ ID NO:42	AGCCGGGAGATGAGGAAG
SP/RL:AR	SEQ ID NO:35	CTGCAGGAGACAGGTGCC	ASP/RL:AR	SEQ ID NO:43	CCTGGGCTGCTTCACAAC
SP/RL:CR	SEQ ID NO:36	CAATCCCCACCCAACACT	ASP/RL:CR	SEQ ID NO:44	AGGAGGGTGATGGTGAGG
SP/RL:PR	SEQ ID NO:37	CCTGGGGAGTAGCAGTGTT	ASP/RL:PR	SEQ ID NO:45	TGTGATTACTACCTGCC

[00200] Для препаративної ПЛР 8 окремих дрібномасштабних ПЛР-реакцій виконують для кожного шаблону з використанням умов, описаних вище, а продукти поєднують разом і очищують гелем на 3,5 % агарозному гелі, використовуючи набір для очищення гелем Qiagen MinElute™. Концентрації очищених гелем ампліконів визначають за допомогою спектрофотометра Nanodrop, а зразки Solexa готують шляхом об'єднання приблизно 100 нг ампліконів з eZFN цільових і відповідних дикого типу контролів, а також нормалізованих IPK-1 цільових і дикого типу контролів. З eZFN+IPK-1 цільових зразків, IPK-1 цільового зразка й дикого типу контролів одержують і секвенують чотири остаточні зразки Solexa, що містять амплікони. Амплікони клонують в PCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) і надають для секвенування для валідації праймерів перед Solexa секвенуванням.

Приклад 4.2: Секвенування і аналіз Solexa

[00201] Solexa секвенування приводить до виробництва тисяч послідовностей. Послідовності аналізують із використанням сценаріїв аналізу DAS Next Generation Sequence (NGS). Послідовності низької якості (послідовності з показником якості відсікання <5) відфільтровують. Потім послідовності вирівнюють відповідно до еталонної послідовності й оцінюють на інсерції/делеції (інделі) на сайті розщеплення ZFN, викликані ZFN-опосередкованим розщепленням і NHEJ-опосередкованим відновленням, які часто викликають інделі, які свідчать про активність ZFN. Коригованню активності визначають по кількості делецій більше однієї пари основ в "розриві" послідовності між сайтами зв'язування білків ZFN після вирахування фонові активності. Активність для кожного eZFN у дослідженні розраховують у порівнянні з контролем і нормалізованою з IPK-1 ZFN активністю. Нормалізовану активність для кожного eZFN потім порівнюють поряд із eZFN, які використовуються в дослідженні. Активність також оцінюють на рівні вирівнювання послідовності (еталон у порівнянні із продуктом Solexa) по наявності інделів на сайті розщеплення eZFN.

[00202] Як продемонстровано на Фігурі 11, сім з восьми eZFN демонструють коригувальну активність у кукурудзі.

Приклад 5: Оцінювання eZFN у тютюні

Приклад 5.1: Стабільна інтеграція послідовності сайту зв'язування мульти-eZFN

[00203] Для того, щоб створити трансгенні рослинні події з інтегрованою копією послідовності сайту зв'язування мульти-eZFN, описаною вище, диски листів (1 см²), вирізані з рослин тютюну сорту Petit Havana (наприклад, подія 1585-10, що містить раніше інтегрований ZFN-IL1 сайт зв'язування), стерильно вирощені на MS середовищі (Phytotechnology Labs, Shawnee Mission, KS) з 30 г/л сахарозою в Phytotrays (Sigma, St. Louis, MO), флоатували протягом ночі на культурі Agrobacterium LBA4404, що містить плазмиду pDAB105900, вирощену до OD₆₀₀~1,2, блотували сухою на стерильний фільтрувальний папір і помістили на те ж середовище з додаванням 1 мг/л індолилоцтової кислоти і 1 мг/л бензамінопуринів на чашки 60 × 20 мм (5 дисків на чашку). Після 72 годин спільного культивування диски листів перенесли в те ж середовище з 250 мг/л цефотаксиму і 5 мг/л BASTA®. Через 3-4 тижні сходи перенесли в середовище MS з 250 мг/л цефотаксиму і 10 мг/л BASTA® в Phytotrays для додаткових 2-3 тижнів до збору листів і молекулярного аналізу.

Приклад 5.2: Кількість копій і аналіз ОТП послідовності сайту зв'язування мульти-eZFN

трансгенних подій

[00204] ДНК-ізоляція. Трансгенні тканини рослини тютюну збирають із Basta®-стійких сходів і ліофілізують протягом щонайменше 2 днів в 96-ямкових збираючих планшетах. Потім ДНК ізолюють із використанням 96-ямкового набору для екстракції DNEASY™ (Qiagen, Valencia, CA) відповідно до інструкцій виробника. Для руйнування тканин використовують подрібнювач

тканини моделі 2-96A Kleco (Garcia Manufacturing, Visalia CA).
[00205] Кількісний аналіз ДНК. Отриману в результаті геномну ДНК піддають кількісному аналізу з використанням набору для ДНК-аналізу QUANT-IT® Pico Green (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). П'ять попередньо квантифікованих ДНК-стандартів у діапазоні від 20 нг/мкл до 1,25 нг/мкл (серійно розведених) використовують для генерування стандартної кривої. Невідомі зразки спочатку розводять до розведень 1:10 або 1:20, щоб вони знаходились в межах лінійного діапазону аналізу. Змішують 5 мкл розведених зразків і стандартів з 100 мкл розведеного субстрату Pico Green (1:200) і інкубують протягом десяти хвилин у темряві. Флуоресценцію реєструють за допомогою рідера планшетів Synergy2 (Biotek, Winooski, VT). Концентрацію геномної ДНК оцінюють по розрахунках зі стандартної кривої після корекцій фонові флуоресценції. Потім ДНК розбавляють із використанням ТЕ або води до загальної концентрації, яка дорівнює 10 нг/мкл, з використанням автоматизованого рідинного маніпулятора Biorobot3000 (Qiagen).

[00206] Оцінювання кількості копій. Передбачувані трансгенні події аналізують на предмет складності інтеграції з використанням мультиплексних аналізів гідролізу ДНК-зонда, аналогічних аналізам TAQMAN®. Кількість копій мультисайтової конструкції оцінюють за допомогою послідовність-специфічних праймерів і зондів як для трансгенної ФАТ, так і для ендogenous еталонного гена тютюну, PAL. Аналізи для обох генів розробляють із використанням програмного забезпечення Lightcycler® Probe Design Software 2.0. ПЛР у реальному часі для обох генів оцінюють за допомогою системи Lightcycler®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Для ампліфікації готують еталонну суміш зондів LightCycler®480 Probes Master в 1X кінцевій концентрації в 10 мкл об'єму мультиплексної реакції, що містить 0,4 мкМ кожного праймера і 0,2 мкМ кожного зонда (Таблиця 4). Два етапи реакції ампліфікації здійснюються з екстенсією при температурі 58 °C протягом 38 секунд і придбанням флуоресценції. Всі зразки проводять у трьох екземплярах і для аналізу кожного зразка використовують усереднені значення Ct. Аналіз даних ПЛР у реальному часі проводять із використанням програмного забезпечення LIGHTCYCLER® з використанням відносного квантового модуля і на основі $\Delta\Delta C_t$ -способу. Для цього включають зразок гДНК із калібратора однієї копії з метою нормалізації результату. Подію калібратора однієї копії ідентифікують за допомогою Саузерн аналізу і підтверджують наявністю однієї вставки ФАТ гена.

Таблиця 4:

Праймери і зонди, використовувані в аналізах гідролізу зонда ФАТ і PAL

Назва	Послідовність (5'-3')	Тип	Зонд
TQPATS (SEQ ID NO:9)	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT	Праймер	NA
TQPATA (SEQ ID NO:10)	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAAACAGT	Праймер	NA
TQPATFQ (SEQ ID NO:11)	CY5-GGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG-BHQ2	Зонд	Cy5
TQPALS (SEQ ID NO:12)	TACTATGACTTGATGTTGTGTGGTGA	Праймер	NA
TQPALA (SEQ ID NO:13)	GAGCGGTCTAAATTCCGACCCTTATTTTC	Праймер	NA
TQPALFQ (SEQ ID NO:14)	6FAM-AAACGATGGCAGGAGTGGCCTTTTCTATCAAT-BHQ1	Зонд	6FAM

[00207] ПЛР. Згодом проводять скринінг подій низьких копій (1-2) за допомогою ПЛР для

інтактної одиниці транскрипції рослини (ОТР) для ФАТ гена й інтактного мульти-eZFN сайту зв'язування.

Приклад 6: Тестування eZFN-розщеплення на послідовності сайту зв'язування мульти-eZFN

[00208] Для тестування здатності eZFN полегшувати цільове розщеплення в інтегрованій

послідовності сайту зв'язування мульти-eZFN, використовують аналіз перехідних процесів на основі перехідної експресії eZFN-конструкцій за допомогою спільного культивування *Agrobacterium* і дисків тютюнового листу. Диски листів (1 см²), вирізані із трансгенних подій, що містять одну копію повної довжини послідовності сайту зв'язування конструкції, що містить мульти-eZFN (а також одну копію повної довжини ZFN-IL 1-конструкції), флоатують протягом ночі на культурі *Agrobacterium*, вирощеній до OD₆₀₀~1,2, блотують сухою на стерильний фільтрувальний папір і потім поміщають на те ж середовище з додаванням 1 мг/л індолилоцтової кислоти й 1 мг/л бензамінопуринів. Для кожного eZFN, що тестується, використовують три види обробки - pDAB1601 (негативний контроль - тільки ФАТ), тільки pDAB4346 (позитивний контроль - ZFN-IL1 тільки) і pDAB4346+pDABeZFN-x (ZFN-IL1+eZFN, що підлягає тестуванню) - із двадцятьма дисками листів для обробки.

Приклад 6.1: Секвенування

[00209] Геномну ДНК ізолюють із оброблених *Agrobacterium* трансгенних дисків з листів тютюну, використовуючи набір для екстракції ДНК Qiagen. Всі процедури обробки виконують у двох екземплярах, а геномну ДНК із усіх зразків ресуспендують в 100 мкл води й визначають концентрацію за допомогою спектрофотометра Nanodrop. Рівні кількості геномної ДНК із кожного повтору для індивідуальної обробки поєднують разом і використовують у якості вихідного шаблону для генерації Solexa амплікону.

[00210] ПЛР-праймери для ампліфікації регіонів, що охоплюють послідовності сайту зв'язування мульти-eZFN і сайт розщеплення цільових (eZFN-оброблених) і контрольних зразків, були придбані в компанії Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) і очищені за допомогою високоефективної рідинної хроматографії ВЕРХ. Оптимальні умови ампліфікації визначають за допомогою ґрадієнтної ПЛР із використанням 0,2 мкМ відповідних праймерів, Accuprime Pfx Supermix (1.1x, Invitrogen, Carlsbad, CA) і 100 нг шаблонної геномної ДНК в 23,5 мкл реакції. Циклічні параметри включають початкову денатурацію при температурі 95°C (5 хв.), з наступними 35 циклами денатурації (95°C, 15 с), відпалом [55-72°C, 30 с], екстенсією (68°C, 1 хв.) і остаточною екстенсією (72°C, 7 хв.). Продукти ампліфікації аналізують на 3,5 % ТАЕ агарозних гелях. Після визначення оптимальної температури відпалу (56,1°C) проводять препаративні ПЛР-реакції для валідації кожного набору ПЛР-праймерів і для генерування амплікону Solexa.

[00211] Для препаративної ПЛР 8 окремих дрібномасштабних ПЛР-реакцій виконують для кожного шаблону з використанням умов, описаних вище, і продукти поєднують разом і очищають гелем на 3,5 % агарозному гелі, використовуючи набір для очищення гелем Qiagen Minelute™. Концентрації очищених гелем ампліконів визначають за допомогою спектрофотометра Nanodrop, а для одержання кінцевого зразка секвенування Solexa (800 нг загального зразка) поєднують приблизно 200 нг кожного амплікону. Амплікони також клонують в PCR-Blunt II-TOPO і надають для нормального секвенування для валідації праймерів перед Solexa секвенуванням. Проводять аналіз Solexa (Shendure et al. (2008) Nat. Biotechnology, 26: 1135-1145) і аналізують послідовності.

Приклад 6.2: Секвенування і аналіз Solexa

[00212] Проведення Solexa секвенування приводить до виробництва тисяч послідовностей. Послідовності аналізують із використанням сценаріїв аналізу DAS NGS. Послідовності низької якості (послідовності з показником якості відсікання <5) відфільтровують. Потім послідовності вирівнюють відповідно до еталонної послідовності (pDAB105900, що містить мульти-eZFN сайт зв'язування) і оцінюють на інсерції/делеції (інделі) на сайті розщеплення. Розраховували активність, що коригується (%NHEJ) для кожного eZFN і неопрацьованих контролів (кількість послідовностей високої якості з інделями/загальна кількість послідовностей високої якості x 100), що продемонстровано на Фігурі 12 нижче. Активність 8-eZFN у двох трансгенних тютюнових подіях (105900/№33 і 105900/№45) продемонстрована (Фігура 12). Три з восьми eZFN є активними у двох протестованих трансгенних тютюнових подіях. Активність також оцінюють на рівні вирівнювання послідовності (еталонна в порівнянні із продуктом solexa) по наявності інделів на сайті розщеплення eZFN в eZFN-оброблених зразках.

[00213] Всі комбінації ZFN мономерів ("праві" і "ліві") половини були активні в аналізі дріжджів. Дані, описані для експериментів з кукурудзою і тютюном, демонструють, що деякі або більшість із комбінацій є активними у рослин, підтверджуючи можливість використання значної кількості перестановок двох ZFN мономерів із чотирьох оригінальних ZFN, відібраних для

дослідження.

Приклад 7: Внутрішньоалельна рекомбінація

[00214] Внутрішньоалельна рекомбінація дозволяє розвиток і оптимізацію із двох незалежних блоків трансгенів, які потім можуть бути складені разом в одному локусі за допомогою рекомбінації. Для підвищення рівня рекомбінації між двома блоками, дволанцюгове розщеплення ініціює ДНК-обмін за допомогою генної конверсії або хроматидного обміну.

[00215] Для того, щоб продемонструвати цю концепцію у рослин, трансгенні вставки, продемонстровані на Фігурі 13, зроблені в *Arabidopsis thaliana*. Конструкції включають блоки генів, які містять селективний маркер (неоміцин фосфотрансфераза (НФТ II) або гігromіцин фосфотрансфераза (ГФТ), і маркер, що піддається оцінці (β -глюкуронідаза (ГУО) або білок з жовтою флуоресценцією (ЖФБ)). Ці блоки генів знаходяться в ідентичних місцях розташування геному, але зміщені відносно один одного приблизно на 2 кб. Рекомбінація між двома блоками здійснюється шляхом комбінації хромосом, що несуть кожний із двох блоків в одній рослині шляхом схрещування, а потім - повторного схрещування потомства рослин, що експресують ZFN, які розщеплюють у центральному місці розташування між двома блоками (чорна планка над CMI на Фігурі 13). ZFN експресуються за допомогою мейозу специфічного/кращого промотора. Послідовності посадкового майданчика, що використовуються, включають ті, які описані в заявці на патент США № 61/297641, що включена в даний документ як посилання.

[00216] Для створення незалежних блоків на однаковому місці геному була зроблена конструкція, що включає обидва блоки в суміжному розташуванні (Фігура 14). Щоб створити рослини, які несуть тільки незалежні блоки, кожний блок вирізають в окремих гібридах з використанням ZFN, призначених для вирізання ДНК на обох сторонах від відповідного блока у відповідному ZFN сайті зв'язування (червоні й сині смуги). Фігура 15 демонструє, що блоки вирізають, створюючи вставки єдиного блока, після схрещування з відповідними лініями (Арабідопсис, що експресує ZFN). Ці лінії несуть ген ФАТ як селективний маркер. Відновлення рослин з очікуваними фенотипами (ГіР+, КанР-, ФАТ+, ЖФБ+ або КанР+, ГіР-, ФАТ+, ГУО+) підтверджене через скринінг фенотипу (резистентність до гербіцидів для ГіР, КанР і ФАТ генів або підлягаюча оцінці експресія маркерного гена ГУО й ЖФБ) або за допомогою молекулярного аналізу, такого як ПЛР і Саузерн. Рослини, що несуть один із двох різних блоків, схрещують для генерування потомства ГіР+, КанР+, ФАТ-, ГУО+, ЖФБ+.

[00217] Після молекулярної характеристики отриманих у результаті рослин, рослини з підтвердженим вставками схрещують із лініями, які експресують ZFN, сайт зв'язування якого знаходиться між двома блоками, за допомогою мейоз-специфічного промотора для здійснення обміну ДНК. Це приводить до укладення двох блоків разом в одному місці ДНК. Остаточні складені гени рослин несуть ГіР+, КанР+, ГУО+, ЖФБ+ конфігурацію в якості єдиного розділяючого локусу. Крім того, рослини, що містять один із блоків, схрещують із одним із двох мономерів, що містять мейозний промотор/ZFN конструкції, одержують гомозиготні рослини для двох вставок, а потім схрещують разом.

Приклад 7.1: ДНК-конструкція

[00218] Стратегії клонування, розгорнуті для будівництва ZFN-Конструкцій, були, по суті, описані в патентних публікаціях США під номерами 2009/0111188A1 і 2010/0199389. Фігура 9 зображує типову касету експресії eZFN. ZFN-кодуючі послідовності, експресуються за допомогою ZmUbi1 промотора (промотор, 5' нетрансльованого регіону (UTR) і інтрон, отриманий з гена убіквітін 1 (убі-1) *Zea mays*; Christensen et al. (1992) Plant Molec. Biol. 18(4), 675-89). Згодом їх клонували в бінарний вектор призначення GATEWAY™, що містить промотор рису актин 1, який стимулює експресію ФАТ гена. Отримані в результаті плазміді рDAB105951 (ZFN1, CL:AR), 105954 (ZFN8, RL:AR), 105952 (ZFN3, AL:PR), 105953 (ZFN6, CL:RR), позначені як конструкції ексцизор Блока 1 (eZFN1, 8) або ексцизор Блока 2 (eZFN3, 6), відповідно, переносять у штам *Agrobacterium* DA2552recA.

[00219] Штам *Agrobacterium* DA2552 був зроблений компетентним для електропорації за допомогою виготовлення стартової культури шляхом посіву штаму DA2552 з вихідного розчину гліцерину в 10 мл середовища YEP, що містить спектиноміцин (спек) (100 мкг/мл) і еритроміцин (ери) (150 мкг/мл). Інкують 10 мл культури протягом ночі при температурі 28 °C при 200 оборотах/хвилину. П'ять мілілітрів стартової культури використовують для інокуляції 500 мл YEP з відповідними антибіотиками у відповідним чином промарковану колбу Ерленмейера об'ємом 1,5 л. Культуру інкують протягом ночі при температурі 28 °C при швидкості 200 оборотів/хвилину. Після інкубації протягом ночі культуру охолоджують, помістивши її на вологу крижану лазню й ніжно обертаючи. Клітини зберігають при температурі 4 °C протягом всіх наступних кроків. Клітини осаджують центрифугуванням при 4000 x g протягом 10 хв. при температурі 4 °C у стерильних промаркованих центрифужних посудинах у попередньо

охолоджену роторі. Супернатант зливають і видаляють, потім додають від 5 мл до 10 мл крижаної стерильної бідистильованої води, а клітини набирають і м'яко піпетують догори і вниз доти, поки не зникнуть скупчення. Об'єм суспензії доводять приблизно до 500 мл крижаною стерильною бідистильованою водою. Клітини осаджують центрифугуванням при 4000 x г протягом 10 хв. при температурі 4 °C у попередньо охолоджену роторі. Супернатант видаляють і додають від 5 мл до 10 мл крижаної стерильної бідистильованої води, потім використовують стерильну піпетку із широким отвором для м'якого піпетування клітин догори і вниз, доти, поки не зникнуть скупчення. Об'єм суспензії доводять приблизно до 250 мл крижаною стерильною бідистильованою водою, а клітини знову осаджують центрифугуванням при 4000 x г протягом 10 хв. при температурі 4 °C у попередньо охолоджену роторі. Супернатант видаляють і додають від 5 мл до 10 мл крижаної стерильної бідистильованої води, осад обережно ресуспендують і кінцевий об'єм доводять до 50 мл крижаною стерильною бідистильованою водою. Клітини осаджують центрифугуванням при 4000 x г протягом 10 хв. при температурі 4 °C у попередньо охолоджену роторі. Клітини знову ресуспендують у кінцевому обсязі 5 мл 10 % (об'єм/об'єм) крижаного стерильного гліцерину. Клітини розподіляють в аліквотах 50 мкл у стерильні мікроцентрифужні пробірки об'ємом 0,5 мл і заморожують у рідкому азоті.

[00220] Двадцять мікролітрів компетентних клітин DA2552 піддають електропорації з 50 нг плазмідної ДНК із використанням системи електропорації GENE PULSER® XCELL® (BioRad Hercules, CA) відповідно до заданих виробником налаштувань і протоколів для електропорації *Agrobacterium*. Клітини відновлюють протягом 2 годин в SOC при температурі 28 °C, а потім покривають YEP спек/ери агарні планшети й вирощують протягом 48 год. при температурі 28 °C.

Приклад 7.2: Конструкція локусу обміну

[00221] ДНК-конструкцію локусу обміну готують із GATEWAY™ векторів, що включають вектор 1: AtAct2 промотор (AtAct2 промотор v2 (промотор, 5' нетрансльований регіон і інтрон із гена актину *Arabidopsis thaliana* (ACT2); An et al. (1996) Plant J. 10, 107-121)/GUS (Jefferson, (1987) EMBO J. 6, 3901-3907)/AtuORF23 3' UTR (3' нетрансльований регіон (UTR), що містить термінатор транскрипції й сайт поліаденілування відкритої рамки зчитування 23 (ORF23) *Agrobacterium tumefaciens* pTi15955; Barker et al., (1983) Plant Molec. Biol. 2(6):335-50): AtAct2 промотор/НФТII (Bevan et al. (1983) Nature 304, 184-187)/AtuORF23 3' UTR, оточений eZFN 1 і 8; вектор 2: синтетичний 2 кб регіон із eZFN 4 і 7 у центрі послідовності; і вектор 3: CsVMV промотор/ГФТ (Kaster et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11 (19), 6895-6911 (1983)/AtuORF23 3' UTR:AtUbi10 промотор (промотор, 5' нетрансльований регіон і інтрон із гена поліубіквітин 10 (UBQ10) *Arabidopsis thaliana*; Norris et al. (1993) Plant Molecular Biology 21(5):895-906)/PhiYFP (Shagin et al., (2004) Molecular Biol. Evol. 21:841-850)/AtuORF23 3' UTR, оточений eZFN 3 і 6. Вектор призначення готують за допомогою вставки двох 1 кб рандомізованих синтетичних послідовностей ДНК у кістяк бінарного вектора *Agrobacterium*, із сайтами рестрикції, включеними між ними для того, щоб клонувати GATEWAY™ ccdB касету негативного селективного маркера. Вектори входу клонують у вектор призначення за допомогою реакції LR Clonase. Отриманий у результаті вектор pDAB100646 (Фігура 16) переносять в *Agrobacterium*, як описано вище.

Приклад 7.3: трансформація Арабідопсису

[00222] Всі трансформації в Арабідопсисі були виконані згідно способів, описаних у роботі Clough & Bent (1998 Plant J., 16, 735-743).

Ексцизорні лінії

[00223] Конструкції "ексцизорної" лінії володіють геном фосфінотрицин ацетилтрансфераза (ФАТ), який передає резистентність до глюфосинату. Через сім, десять і тринадцять днів після посадки, рослини T1 обприскують розчином гербіциду Liberty у концентрації 284 мг/л (200 грам активного інгредієнта на літр (г ai/л) глюфосинату, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) в об'ємі розпилювача, який дорівнює 10 мл/лотов (703 л/га) за допомогою наконечника-розпилювача зі стисненим повітрям DeVilbiss, щоб доставити ефективний рівень 200 г ai/га глюфосинату на аплікацію. Рослини що вижили (активно зростаючі рослини) визначають через 4-7 днів після остаточного розпилення і пересаджують в індивідуальні 3-дюймові горщики, підготовлені із ґрунтовим середовищем (Metro Mix 360).

[00224] Експресію eZFN в ексцизорних подіях визначають за допомогою зворотної транскриптази ПЛР (ЗТ ПЛР), а кількість копій визначають за допомогою кПЛР, як описано тут для ФАТ гена, і підтверджують Саузерн аналізом. Три події низьких копій експресії ZFN на високому рівні перехресчуються з подіями локусу обміну.

Лінії локусу обміну

[00225] Лінії локусу обміну роблять в Арабідопсисі наступними способами, описаними в роботі Clough & Bent (1998 Plant J., 16, 735-743), включаючи селекцію на середовищі, що містить гігromіцин або канаміцин.

Приклад 7.4: Схрещування Арабідопсису і відновлення потомства

[00226] Схрещування подій локусу обміну із двома наборами ексцизорних ліній Блока 1 і Блока 2 виконують із використанням стандартних способів.

[00227] Насіння від гібридів вирощують на гігromіцині (делеція Блока 1) і канаміцині (делеція Блока 2) і резистентні рослини аналізують на експресію ГУО (делеція Блока 1) або експресію ЖФБ (делеція Блока 2). Активність ГУО визначають за допомогою гістохімічного аналізу (Jefferson et al. (1987) Plant Mol. Biol. Rep 5, 387-405), а активність ЖФБ - за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Рослини із заданими фенотипами (Блок 1 позитивні: ГУО+, НФТ+, ГФТ-, ЖФБ-, Блок 2 позитивні: ГУО-, НФТ-, ГФТ+, ЖФБ+) аналізують способом ПЛР і Саузерн, щоб підтвердити бажану конфігурацію генів. Листи від обраних рослин офарблюють біалафос-розчинами для оцінки, які з них є ФАТ+.

[00228] Рослини, що містять касети генів Блок 1 і Блок 2, схрещують і вибирають потомство на гігromіцинових/канаміцинових планшетах. ГіР/КанР рослини аналізують на наявність всіх генів за допомогою ПЛР і скринінга фенотипу. F1 рослини з бажаним фенотипом вирощують і схрещують із рослинами із промотором мейозу/ZFN для досягнення рекомбінації між Блоком 1 і Блоком 2. Отримане в результаті потомство вирощують на гігromіцинових/канаміцинових планшетах. Рослини, що вижили під час селекції, перевіряються на ГУО і ЖФБ. Підтвердження і характеристику рекомбінантів виконують за допомогою ПЛР, Саузерн аналізів, секвенування і аналізів сегрегації.

Приклад 8: Укладення гена в eZFN сайтах

[00229] Стратегії, продемонстровані на Фігурах 1, 2, 4, 5 і 6, можуть бути виконані із застосуванням наступних способів.

Дизайн конструкцій

[00230] Різні комбінації сайтів гетеродімерних eZFN можуть бути зібрані як конкатемер у плазмідний вектор, що підходить для трансформації рослини. Фігура 1, Фігура 2 і Фігура 4 ілюструють різні варіанти гетеродімерних eZFN сайтів, які можуть бути включені у вектор і трансформовані в хромосоми рослини.

WHISKERS™ трансформація

[00231] Ембріогенні клітинні культури кукурудзи Hi-II, вироблені, як описано в патенті США № 7179902, використовуються в якості джерела живих рослинних клітин, на яких продемонстрована цільова інтеграція. ДНК-фрагменти, що містять сайти гетеродімерної eZFN, пов'язані з касетою рослинного селективного маркера, використовуються для генерування трансгенних подій. Трансгенні події є ізольованими й охарактеризованими.

[00232] Дванадцять мілілітрів об'єму глобулярної маси (ОГМ) з раніше кріозбереженої клітинної лінії плюс 28 мл кондиціонованого середовища субкультивують в 80 мл рідкого середовища GN6 (N6 середовище (Chu et al. (1975) Sci Sin 18:659-668), 2,0 мг/л, 2,4-D, 30 г/л сахарози, рівень pH 5,8) у колбі Ерленмейєра об'ємом 500 мл і поміщають на шейкер при швидкості 125 оборотів/хвилину і при температурі 28 °C. Цей крок повторюють двічі, використовуючи ту ж клітинну лінію, так, що в цілому 36 мл ОГМ розподіляють в 3 колбах.

[00233] Через 24 години рідке середовище GN6 видаляють і замінюють на 72 мл осмотичного середовища GN6 S/M (N6 середовище, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 45,5 г/л сорбіту, 45,5 г/л манніту, 100 мг/л міо-інозиту, pH 6,0). Колбу інкубують у темряві протягом 30-35 хвилин при температурі 28 °C з помірною швидкістю перемішування (125 оборотів/хвилину). Під час інкубації 50 мг/мл суспензії ниткоподібних кристалів карбіду кремнію (Advanced Composite Materials, LLC, Greer, SC) одержують шляхом додавання 8,1 мл рідкого середовища GN6 S/M до 405 мг стерильних ниткоподібних кристалів карбіду кремнію. Після інкубування в осмотичному середовищі GN6 S/M, вміст кожної колби збирають у центрифужну посудину об'ємом 250 мл. Після того як всі клітини в колбі осідають на дно, надлишковий об'ємний вміст, який приблизно дорівнює 14 мл GN6 S/M рідини, відбирають і збирають у стерильну колбу об'ємом 1 літр для подальшого використання. Попередньо зволожену суспензію ниткоподібних кристалів змішують на максимальній швидкості на вихровій мішалці протягом 60 секунд, а потім додають у центрифужну посудину.

[00234] Аліквоту 85 мкг очищеного ДНК-фрагмента додають у кожну посудину. Після того як була додана ДНК, посудину негайно поміщають у модифікований комерційний змішувач для фарб Red Devil 5400 (Red Devil Equipment Co., Plymouth, MN) і перемішують протягом 10 секунд. Після перемішування коктейль клітин, середовище, ниткоподібні кристали й ДНК додають до вмісту колби об'ємом 1 літр разом з 125 мл свіжого рідкого середовища GN6 для зниження

осмотичності. Клітинам надають можливість відновлення на шейкері при швидкості 125 оборотів/хвилину протягом 2 годин. Фільтрують 6 мл диспергованої суспензії на фільтрувальному папері Whatman № 4 (5,5 см), використовуючи скляний пристрій, що збирає клітини, пов'язаний із власною вакуумною лінією, так, що одержують 60 фільтрів на посудину.

5 Фільтри розміщують на планшетах 60 × 20 мм твердого середовища GN6 (таке ж, як GN6 рідке середовище, за винятком 2,5 г/л гелеутворювача Gelrite) і культивують при температурі 28°C у темряві протягом 1 тижня.

Ідентифікація й ізоляція передбачуваних цільових інтеграційних трансгенних подій

10 [00235] Через один тиждень після доставки ДНК, фільтрувальний папір переносять на планшети 60 × 20 мм із селективним середовищем GN6 (1H) (N6 середовище, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 100 мг/л міо-інозиту, 2,5 г/л Gelrite, pH 5,8), що містить селективну речовину. Ці селективні планшети інкубують при температурі 28°C протягом одного тижня в темряві. Після 1 тижня селекції в темряві, тканину вкладають у свіже середовище за допомогою зішкребу ½ клітин з кожного планшета в пробірку, що містить 3,0 мл GN6 агарозного середовища, яке зберігається при температурі 37-38 °C (N6 середовище, 2,0 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарози, 100 мг/л міо-інозиту, 7 г/л Searplaque® агарози, pH 5,8, автоклавована протягом 10 хвилин при температурі 121 °C).

20 [00236] Суміш агароза/тканина розбивають за допомогою шпателя, а потім 3 мл суміші агароза/тканина рівномірно виливають на поверхню 100 × 25 мм чашки, що містить GN6 (1H) середовище. Цей процес повторюється для обох половин кожного планшета. Після того як всі тканини залиті, планшети культивують при температурі 28°C у темних умовах протягом періоду часу до 10 тижнів. Передбачувано трансформовані ізоляти, які ростуть у цих селекційних умовах, видаляють із залитих планшетів і переносять на свіже селективне середовище на планшети 60 × 20 мм. Якщо стійкий ріст стає очевидним після приблизно 2 тижнів, подія вважається резистентною до застосовуваних гербіцидів (селективний агент), і аліквоту клітин згодом збирають для аналізу генотипу. Стабільна рослинна трансформація робить єдиний екземпляр інтегрантів, які використовуються для експериментів стекінгу.

Молекулярна характеристика подій

30 [00237] Геномну ДНК (гДНК) отримують із ізольованих клітин кукурудзи, описують і використовують у якості шаблону для експериментів ПЛР-генотипування. Екстрагують гДНК приблизно з 100-300 мкл об'єму глобулярної маси (ОГМ) Hi-II каллюса, який ізольований відповідно до протоколів виробників, докладно описаних в наборі DNEASY® 96 Plant Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA). Геномну ДНК елюють в 100 мкл елюючого буфера, який поставляється з набором, що дає остаточну концентрацію 20-200 нг/мкл, а потім аналізують за допомогою заснованих на ПЛР способів генотипування.

Молекулярний аналіз кількості копій

40 [00238] INVADER® або аналізи гідролізу зонда виконуються для скринінгу зразків резистентного до гербіцидів каллюса для виявлення тих зразків, які містять одну копію інтеграції Т-ланцюжка ДНК. Детальний аналіз проводять із використанням праймерів і зондів, специфічних для касет експресії генів. Ідентифікують події однієї копії для додаткових аналізів.

45 [00239] Користувальні аналізи INVADER® були розроблені для аналізу селективного маркерного гена в Hi-II каллюсі за допомогою Third Wave Technologies (Madison, WI). Геномні зразки ампліфікують за допомогою набору для аналізу INVADER®, результати зчитування збирають. Із цих зчитувань визначають, у скільки разів вони відрізняються від нуля (тобто від вихідних даних) для кожного каналу визначають для кожного зразка за допомогою розподілу показника зразка вихідного сигналу на показник відсутності шаблонового вихідного сигналу. Із цих даних будують стандартну криву, яка щонайкраще відповідає визначеній за допомогою аналізу лінійної регресії. Використовуючи параметри, визначені із цієї відповідності, потім розраховується очевидна кількість копій селективного маркера для кожного зразка.

50 Селекція трансгенних подій з цільовою ДНК

[00240] Проводять скринінг подій низьких копій (1-2 копій трансгена) за допомогою ПЛР, як описано вище, для інтактної одиниці транскрипції рослини (ОТР), що містить касету селективного маркерного гена й інтактний сайт eZFN. Кількість копій підтверджується Саузерн аналізом з використанням стандартних способів із селективним маркерним геном. Каллюс із обраних трансгенних подій, що приховує єдину копію, інтактні вставки зберігають.

Балістично-опосередкована доставка ДНК у рослинні клітини, що містять eZFN

60 [00241] Як описано вище, ембріогенні Hi-II клітинні культури кукурудзи виробляють і використовують у якості джерела живих рослинних клітин, в яких продемонстровані цільові інтеграції. Ембріогенні суспензії кукурудзи субкультивують у рідкому середовищі GN6 приблизно протягом 24 годин до експерименту, як описано вище. Надлишок рідкого середовища

видаляють і приблизно 0,4 мл ОГМ клітин тонко розподіляють у колі діаметром 2,5 см над центром чашки Петрі 100 × 15 мм, що містить середовище GN6 S/M, затверділе за допомогою 2,5 г/л Gelrite.

[00242] Клітини культивують у темряві протягом 4 годин. Щоб покрити балістичні частки ДНК, що містить фрагменти донорної ДНК (Блок 1 на Фігурі 1, Блок 2 на Фігурі 2 або Ген 1 на Фігурі 4), 3 мг золотих часток діаметром 1,0 мікрон промивають один раз 100 % етанолом, двічі стерильною дистильованою водою й ресуспендують в 50 мкл води в силіконовій пробірці типу Еппендорф. У цілому 5 мкг плазмідної ДНК (що міститься в одному векторі або в окремих векторах молекул нуклеїнових кислот, що кодують eZFN і фрагмент донорної ДНК), 20 мкл спермідину (0,1 М) і 50 мкл хлориду кальцію (2,5 М) додають окремо до суспензії золота і перемішують на вихровій мішалці. Суміш інкубують при кімнатній температурі протягом 10 хв., осаджують при швидкості 10000 оборотів/хвилину в настільній мікроцентрифузі протягом 10 секунд, ресуспендують в 60 мкл холодного 100 % етанолу і 8-9 мкл розподіляють на кожний макроносій.

[00243] Бомбардування виконують із використанням системи Biolistic PDS-1000/HE™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Планшети, що містять клітини, поміщають на середню полицю в умовах Нg вакууму 1100 фунтів на квадратний дюйм і 27 дюймів і піддають бомбардуванню відповідно до оперативного керівництва. Через шістнадцять годин після бомбардування тканини переносять невеликими групами в GN6 (1H) середовище і культивують протягом 2-3 тижнів при температурі 28° С у темних умовах. Переноси продовжують кожні 2-4 тижня доти, поки не починають з'являтися передбачувані трансгенні ізоляти в результаті інтеграції донорної ДНК. Білафос-резистентні колонії, як правило, аналізують за допомогою ПЛР і Саузерн-блота з використанням способів, докладно описаних вище, для одержання ізолятів, які містять цільові послідовності.

Скринінг для цільових інтеграційних подій за допомогою ПЛР-генотипування

[00244] ПЛР-реакції проводяться для дослідження наявності інтактної копії донорної ДНК. Додаткові реакції фокусують на 5'-межі між мішенню й донором і 3'-межі між донором і мішенню. Ампліфіковані фрагменти вирізають із гелю й очищають у відповідності зі стандартними протоколами. Очищені фрагменти згодом клонують у плазмиду pCR2.1 з використанням набору TOPO TA CLONING® (з вектором pCR2.1) і хімічно компетентних клітин E.coli ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) відповідно до протоколу виробника.

[00245] Вибирають окремі колонії й підтверджують, що вони містять ампліфікований ПЛР-фрагмент. Реакції дволанцюгового секвенування плазмідних клонів виконують, щоб підтвердити, що ампліфікована ПЛР геномна послідовність містить інтегрований донор. Ідентифікують події, які містять донорний фрагмент, що представляють мішень, у якій націлюють кероване гомологією відновлення ZFN-опосередкованого дволанцюгового розриву і цільову інтеграцію донорної ДНК у специфічних генах.

Специфічне застосування генного укладання (стекінгу) з використанням eZFN-сайтів

[00246] Фігура 1 демонструє варіації сайтів множинної інсерції із семи (7) eZFN цільових сайтів, стабільно трансформованих у хромосому рослини. Пари eZFN, які зв'язуються із цільовими сайтами, зображуються у вигляді геометричних фігур. "Блок 1" являє собою екзогенну полінуклеотидну послідовність, яка може бути інтегрована в сайт множинної інсерції відповідної пари eZFN при трансформуванні eZFN, призначеної для розщеплення специфічного сайту eZFN. Спільна трансформація eZFN і "Блок 1" донорної ДНК-послідовності може бути досягнута за допомогою способу балістичної трансформації, раніше описаного вище. Прив'язаність різних інших сайтів eZFN підтримують, коли eZFN, трансформована в рослинну клітину, не розщеплює на цих інших сайтах. "Блок 1", який інтегрується в хромосоми рослин за допомогою гомологічної рекомбінації, приводить у результаті до клітин рослин, які містять послідовність "Блока 1". Отримані в результаті рослинні клітини можна вирощувати в зрілих рослинах і проводити скринінг на наявність "Блока 1" з використанням способів аналітичної молекулярної біології, відомих у даній галузі техніки, таких як Саузерн-блот, Taqman аналіз або Invader аналіз.

[00247] Фігура 2 ілюструє інший варіант Фігури 1, у якому інший eZFN сайт зв'язування є мішенню полінуклеотидної донорної послідовності "Блок 2". У результаті інтеграція фрагмента ДНК робить стабільну рослину, що містить у хромосомі "Блок 2".

[00248] Фігура 4 ілюструє використання "лівого" і "правого" доменів eZFN. Верхня лінія відображає геном рослини із трансформованими лівим і правим eZFN доменами (заштрихований трикутник і шаховий трикутник). Коли відповідний eZFN, доданий у присутності екзогенної молекули, що включає "Ген 1" в оточенні нових і різних гетеродімерних eZFN сайтів, "Ген 1" і оточуючі eZFN сайти вводяться в геном. Результуючі прогени, які містять "Ген 1" і

оточуючі eZFN сайти ідентифікують, і такі рослини можуть бути згодом перенацілені з використанням нових гетеродімерних eZFN сайтів, які не були представлені в рамках батьківської рослини (наприклад, eZFN сайти, що містять заштрихований трикутник і шаховий трикутник).

5 [00249] Фігура 5 і Фігура 6 ілюструють, як eZFN сайти можуть бути використані для укладання нових трансгенів у хромосомне місце розташування. Крім того, ця стратегія надає можливість ексцизії інших касет експресії генів. У деяких випадках касета експресії генів може бути повністю видалена (Фігура 5), в інших сценаріях касета експресії генів може бути видалена в певному поколінні рослин і, в остаточному підсумку, може бути знову введена в потомство 10 цих рослин, що надає можливість переробки касети експресії генів. Видалена маркерна послідовність (Фігура 6) може бути повторно вставлена за допомогою опосередкованої гомологічної рекомбінації націлювання гена, використовуючи протокол, описаний вище. Націлювання гена в гетеродімерних eZFN сайтах завершують із використанням протоколу, описаного вище. У цьому прикладі eZFN сайти зв'язування використовуються, щоб надати 15 можливість in planta видалення будь-яких трансгенів, у тому числі селективних маркерних генів, із трансформованої рослини. Див. попередню заявку на патент США № 61/297628, подану 22 січня 2010 року, включену в даний документ як посилання.

[00250] Всі патенти, заявки на патенти й публікації, згадані тут, включені, таким чином, у якості посилання у всій їхній повноті для всіх цілей.

20 [00251] Незважаючи на те, що розкриття було надано в деяких деталях в якості ілюстрації і прикладу для ясності розуміння, для фахівців у даній галузі техніки буде очевидним, що різні зміни і модифікації можуть бути здійснені без відходу від сутності й об'єму даного винаходу. Відповідно, вищенаведені описи і приклади не повинні бути витлумачені як обмежуючі.

25 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Ізольована рослинна клітина, яка містить ендегенний геном і екзогенну нуклеїнову кислоту, інтегровану в ендегенний геном, екзогенна нуклеїнова кислота містить сайт множинної інсерції, причому зазначений сайт множинної інсерції містить три або більше різних парних сайтів-мішеней для однієї або декількох пар нуклеаз цинкового пальця, причому один сайт-мішень з кожного парного сайту-мішені містить ту саму послідовність, де парні сайти-мішені розташовані таким чином, щоб одна або кілька пар нуклеаз цинкового пальця зв'язувались і розщеплювались як гетеродимери, де парні сайти-мішені відсутні в ендегенному геномі клітини.

2. Клітина за п. 1, де екзогенна нуклеїнова кислота додатково містить одну або більше кодуючих послідовностей.

3. Спосіб інтегрування однієї або більше екзогенних послідовностей у геном рослинної клітини, який включає:

(а) надання однієї або більше пар нуклеаз цинкового пальця в рослинну клітину за п. 1, де нуклеази цинкового пальця зв'язуються із сайтом-мішенню в інтегрованій молекулі нуклеїнової кислоти, так, що вказане зв'язування нуклеаз із їхніми сайтами-мішенями розщеплює геном рослинної клітини; і

(б) введення полінуклеотиду, що містить екзогенну послідовність, в клітину, причому екзогенна послідовність інтегрується в геном рослинної клітини в межах інтегрованої нуклеїнової кислоти.

4. Спосіб за п. 3, який додатково включає повторювання стадії (а) і (б) з додатковими нуклеазами цинкового пальця, які розщеплюють додаткові сайти-мішені в інтегрованій молекулі нуклеїнової кислоти в присутності додаткових екзогенних послідовностей, тим самим вставляючи додаткові екзогенні послідовності в геном рослинної клітини.

5. Спосіб за п. 4, де одна або більше екзогенних послідовностей містять один або більше сайтів-мішеней для нуклеаз цинкового пальця.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 3-5, який **відрізняється** тим, що клітина додатково включає модифікації її геному за межами регіону, що включає інтегровану молекулу нуклеїнової кислоти.

Fig. 1

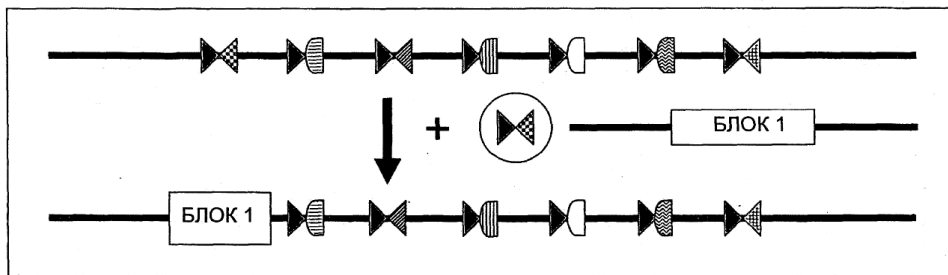


Fig. 2

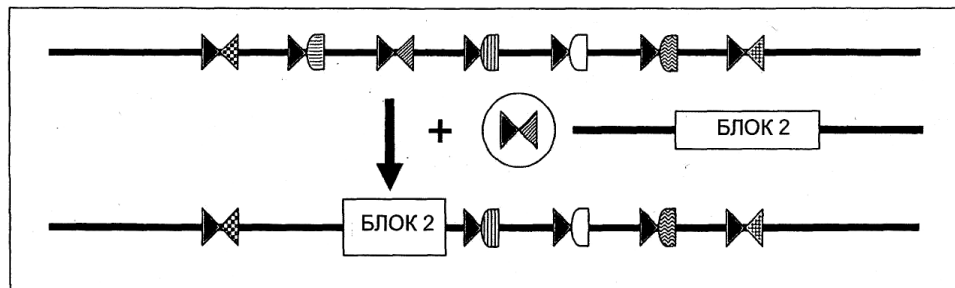
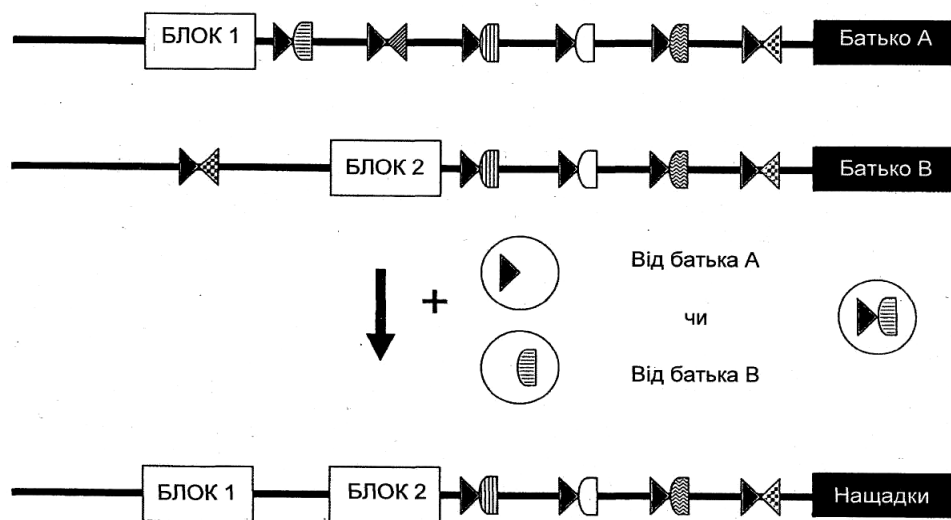
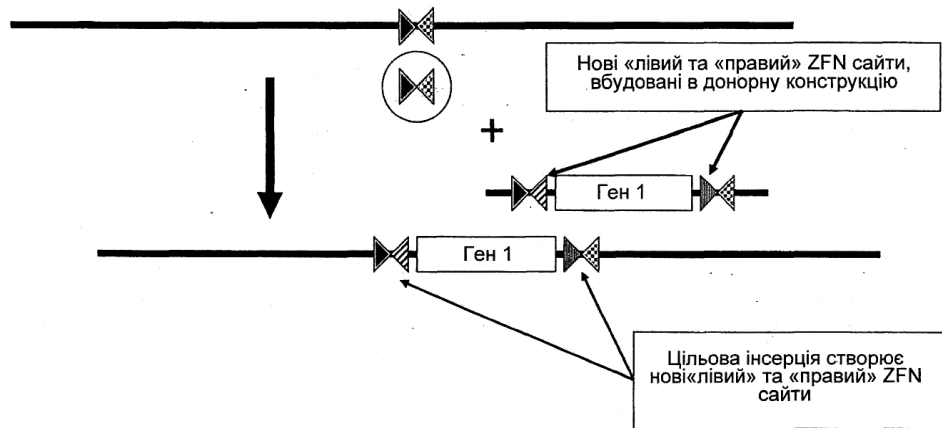


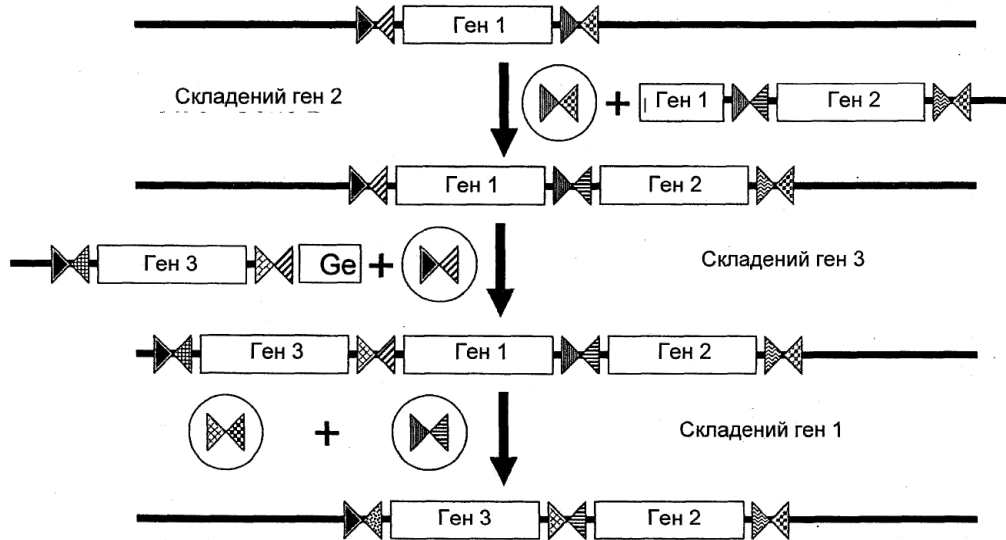
Fig. 3

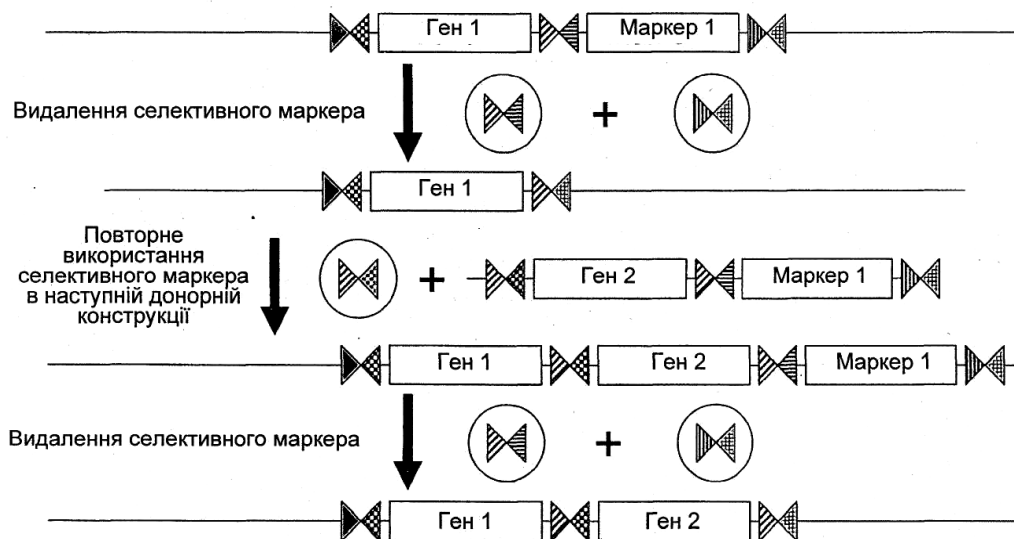


Фіг. 4

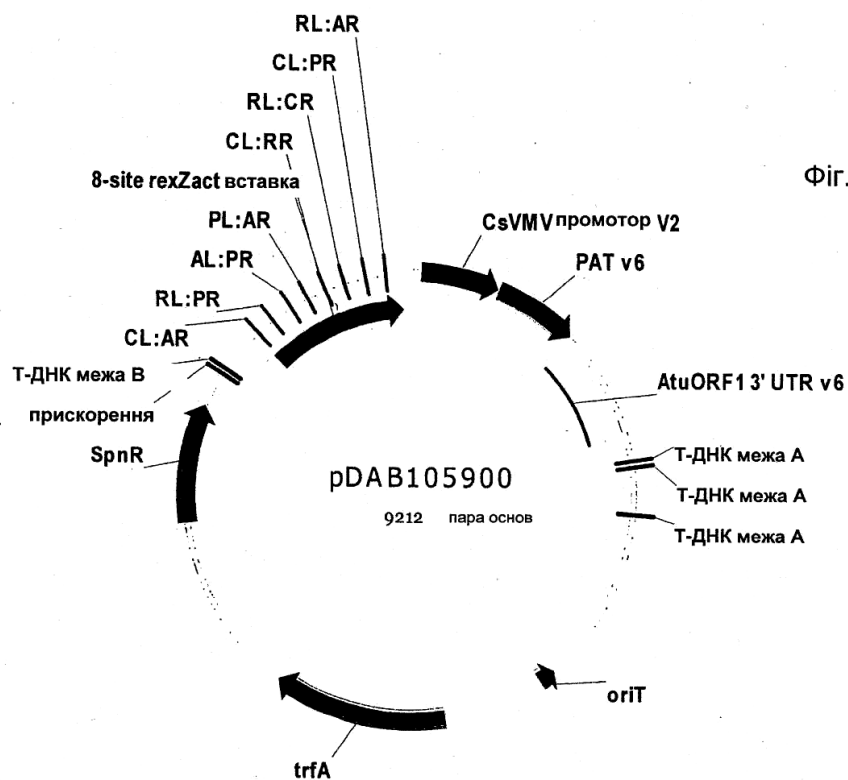


Фіг. 5



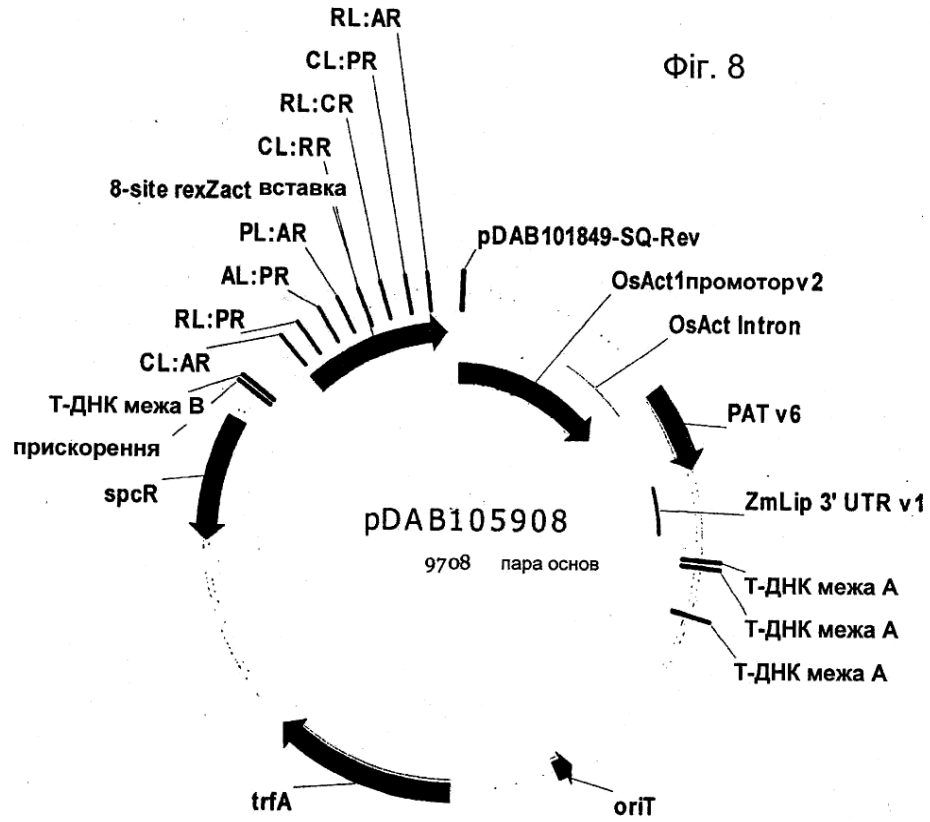


Фиг. 6

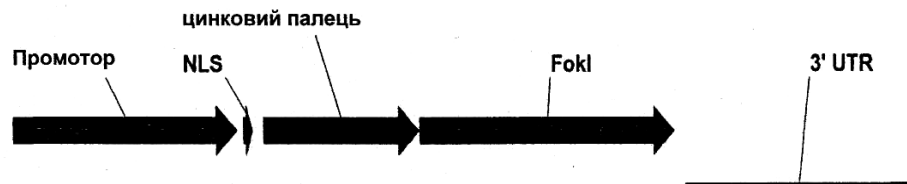


Фиг. 7

Фіг. 8



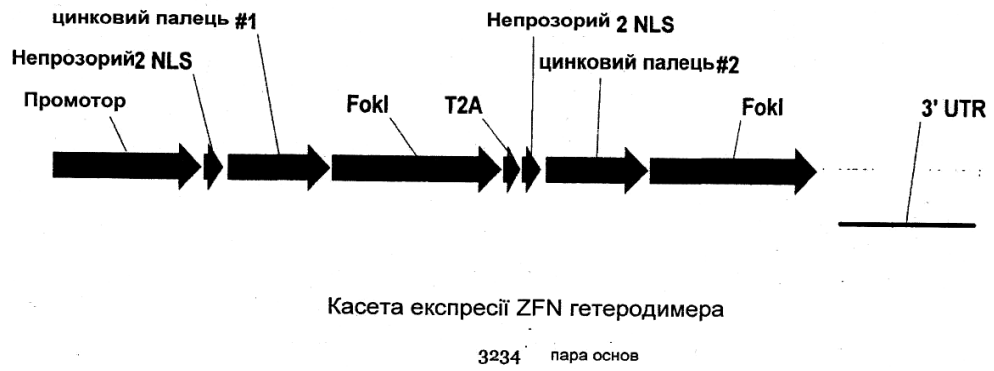
Фіг. 9



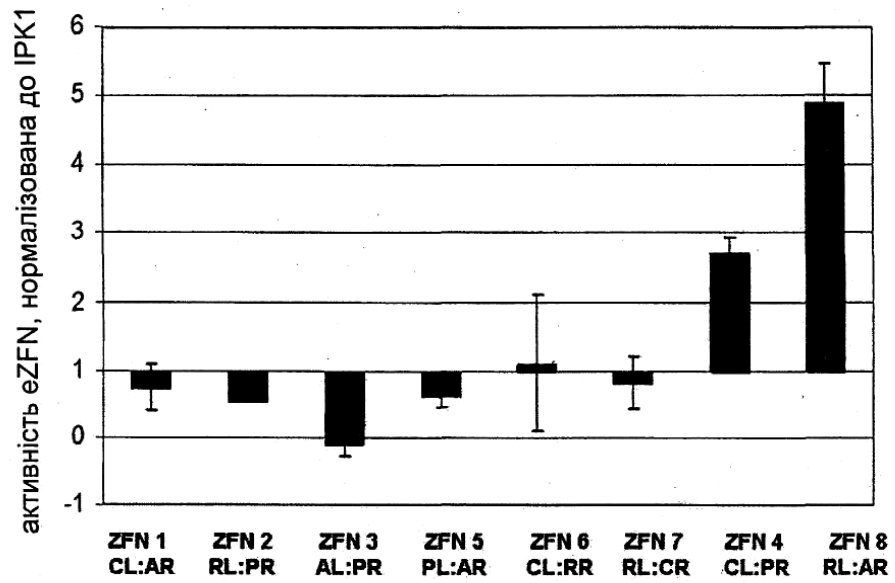
Касета експресії ZFN гомодимера

2077 пара основ

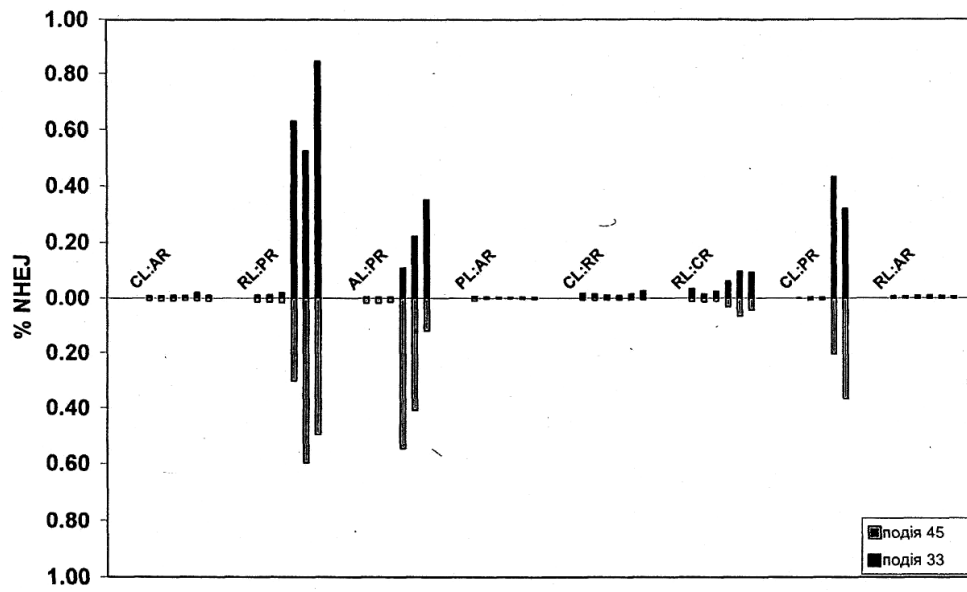
Фіг. 10



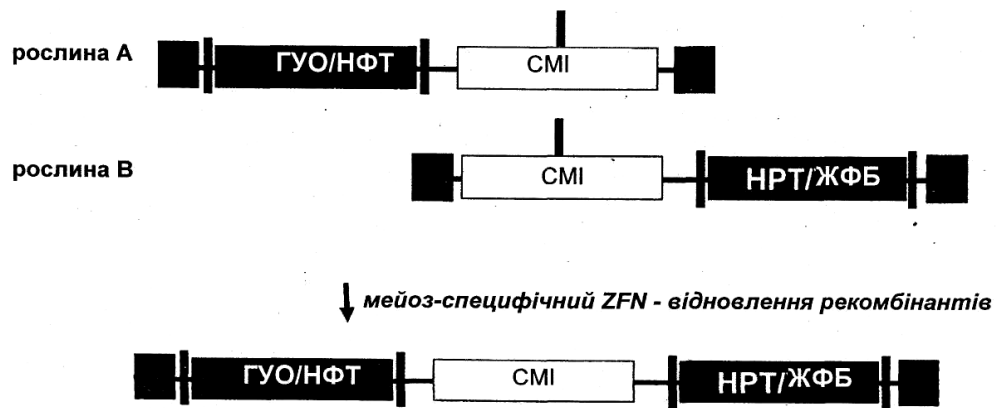
Фіг. 11



Фіг. 12

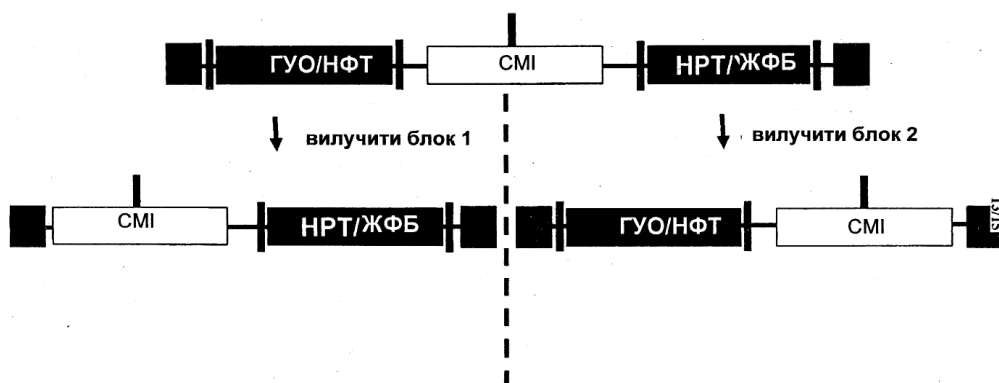


Фіг. 13



GUO = маркер β-глюкуронідази, що піддається оцінці
 HFT = неоміцин фосфотрансфераза
 CMI = сайт множинної інсерції
 ЖФБ = ген жовтої флуоресценції білка

Фіг. 14



ГУО = маркер β-глюкуронідази, що піддається оцінці
 НФТ = неоміцин фосфотрансфераза
 СМІ = сайт множинної інсерції
 ЖФБ = ген жовтої флуоресценції білка

Генна конверсія сестринських хроматид/ кросинговер протягом мейозу, полегшеного шляхом ZFN

Фіг. 15

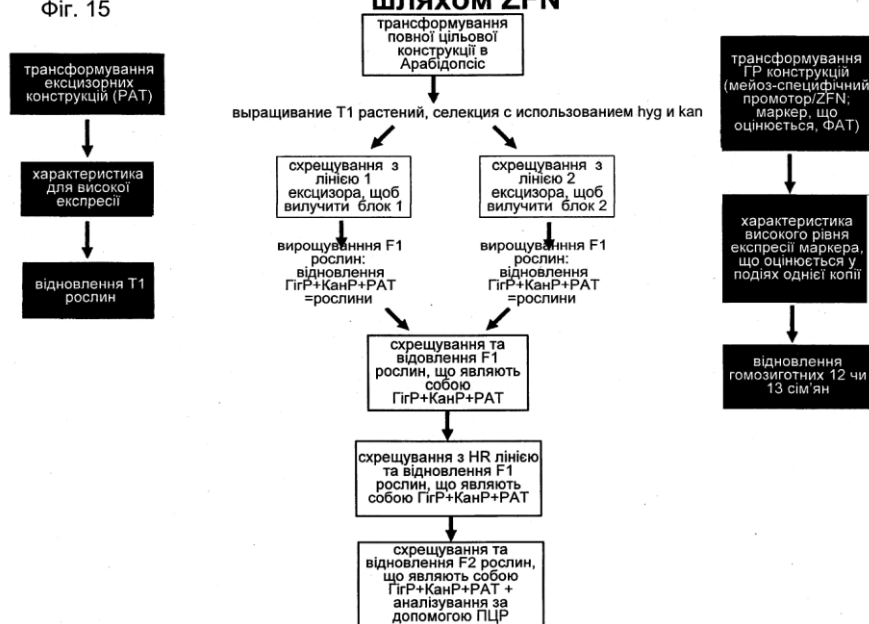
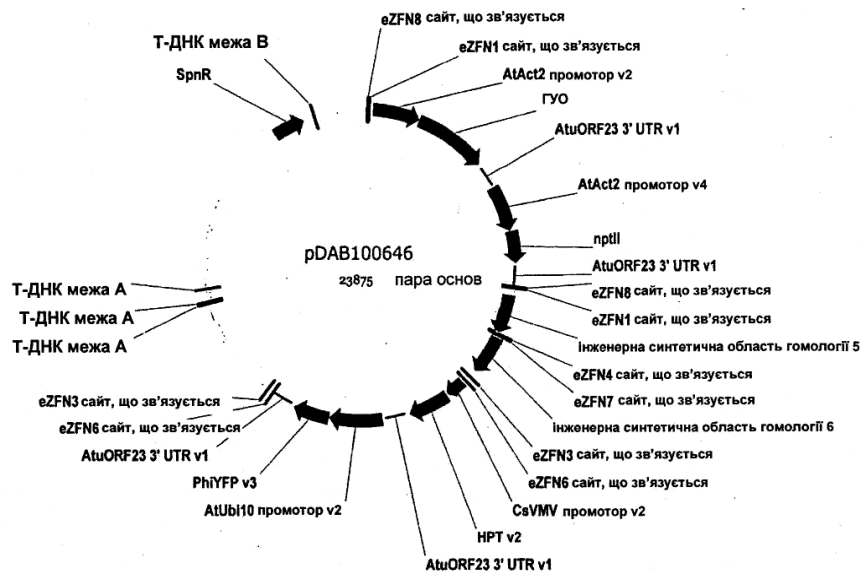


Fig. 16



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601