



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121099** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
C12N 5/00
C12N 15/01 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 08559	(72) Винахідник(и):	Бітем Пітер Р. (US), Гокал Грегорі Ф.В. (US), Шопке Крістіан (US), Сойер Ноель Джой (US), Пірс Джеймс (US), Сеґамі Роза Е. (US), Мозорук Джеррі (US)
(22) Дата подання заявки:	14.03.2014	(73) Власник(и):	СІБАС ЮС ЛЛС, 6455 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121, United States of America (US), СІБАС ЮРОП Б.В., Goesestraatweg 19, NL-CH4421 AD Kapelle, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.04.2020	(74) Представник:	Кістерський Тимофій Арсенійович, реєстр. №457
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/801,320	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Ferrara L et al, "Camptothecin enhances the frequency of oligonucleotide-directed gene repair in mammalian cells by inducing DNA damage and activating homologous recombination", Nucleic Acids Research, Information Retrieval LTD, GB, 05.10. 2004, vol. 32, no. 17, P. 5239 - 5248 Ferrara L et al, "Enhanced oligonucleotide-directed gene targeting in mammalian cells following treatment with DNA damaging agents", Experimental Cell Research, Academic Press, US, 15.10. 2004, vol. 300, no. 1, P. 170 - 179 Fuqiang Chen et al, "High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases", HHS Public Access Author Manuscript, Nature Publishing Group, GB, vol. 8, no. 9, 01.09. 2011, P. 753URL, URL: http://www.nature.com/nmeth/journal/v8/n9/full/nmeth.1653.html Wang Z et al, "Single-stranded oligonucleotide-mediated gene repair in mammalian cells has a mechanism distinct from homologous recombination repair", Biochemical and Biophysical Research Communications, Academic Press INC. Orlando, FL, US, vol. 350, no. 3, P. 568 - 573, 24.11.2006 Puchta et al., "Role of Human Disease Genes for the Maintenance of Genome Stability in Plants", Induced Plant Mutations in the Genomics Era, 01.01.2009, P. 129 - 132 Zarytova et al., "Synthesis of bleomycin A5 oligonucleotide derivatives and site-specific cleavage of the DNA target", Bioconjug Chem, 01.05.1993, vol. 4, no. 3, P. 189 - 193 US 2009/205064 13.08.2009 A1, 13.08.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.03.2013		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.02.2016, Бюл.№ 3		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.04.2020, Бюл.№ 7		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/029621, 14.03.2014		

**(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ СПРЯМОВАНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ГЕНІВ ІЗ
ЗАСТОСУВАННЯМ ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ОЛІГОНУКЛЕОТИДАМИ РЕПАРАЦІЇ ГЕНІВ**

(57) Реферат:

UA 121099 C2

Винахід стосується застосування однієї або декількох сайтспецифічних ендонуклеаз, які вводять одониткові розриви, для поліпшення мутаційного перетворення олігонуклеосоосновами для репарації генів (GRON) як донорами.

[001] Дана заявка претендує на пріоритет на підставі попередньої заявки на патент США № 61/801320, поданої 15 березня 2013 р., зміст якої даним включено в дану заявку за допомогою посилання.

ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ

[002] Даний винахід у цілому відноситься до нових способів підвищення ефективності спрямованої модифікації певних положень у геномних або інших послідовностях нуклеотидів. Крім того, даний винахід відноситься до цільового ДНК, яку модифікували, мутували або позначили за допомогою підходів, описаних у даній заявці. Даний винахід також відноситься до клітин, тканини й організмів, які були модифіковані за допомогою способів згідно з даним винаходом.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

[003] Двониткові розриви ДНК (ДНР) підвищують рівень гомологічної рекомбінації в живих клітинах, і їх застосовують для спрямованого редагування генома за допомогою застосування сконструйованих ендонуклеаз. Ключовим компонентом сконструйованих нуклеаз є домен впізнавання ДНК, що здатний направляти нуклеазу на цільовий сайт генома для одержання двониткового розриву геномної ДНК. Клітинна репарація ДНР завдяки негомологічному з'єднанню кінців (НГЗК) призводить до мутагенних делецій/вставок у цільовому гені. З іншого боку, ДНР може стимулювати гомологічну рекомбінацію між ендегенним цільовим локусом і введеним екзогенно фрагментом гомологічної ДНК із бажаною генетичною інформацією, такий процес називається спрямованим впливом на гени.

[004] У найбільш перспективному способі, що передбачає редагування гена або генома, застосовують спеціально сконструйовані нуклеази з цинковими пальцями (ZFN), тип гібридного ферменту, що складається з ДНК-сполучних доменів білків із цинковими пальцями та домена нуклеази FokI (FN). Методика ZFN, насамперед, включає застосування гібридних білків, отриманих із ДНК-сполучних доменів білків із цинковими пальцями (ZF) і неспецифічно розщеплює домен ендонуклеази FokI. ZF можуть бути зібрані з модулів, які спеціально сконструйовані таким чином, щоб вони дізнавалися про вибрані послідовності ДНК після зв'язування із заздалегідь вибраним сайтом, і ДНР одержують під дією розщеплюючого домена FokI.

[005] Ендонуклеаза FokI спочатку була виділена з бактерії *Flavobacterium okeanoicoites*. Дана нуклеаза типу IIS складається з двох окремих доменів: N-кінцевого ДНК-сполучного домена та C-кінцевого домена, розщеплюючого ДНК. Функція ДНК-сполучного домена складається у впізнаванні непаліндромної послідовності 5'-GGATG-375'-CATCC-3', тоді як каталітичний домен неспецифічно розщеплює двониткову ДНК на певній відстані в 9 і 13 нуклеотидів по ходу транскрипції від сайту впізнавання. У розчині FokI присутній у вигляді неактивного мономеру та стає активним димером після зв'язування з цільовою ДНК й у присутності деяких двовалентних металів. У вигляді функціонального комплексу кожна з двох молекул FokI зв'язується з двонитковою молекулою ДНК і димеризується за допомогою ДНК-каталітичного домена для ефективного розщеплення подвійних ниток ДНК.

[006] Аналогічно, нуклеази також можна одержати, застосовуючи інші білки/домени, якщо вони здатні специфічно впізнавати ДНК. Ефектори TAL належать до великої групи бактеріальних білків, які перебувають у різних штаммах *Xanthomonas* і переміщуються в клітини-хазяїни за допомогою системи секреції III типу, і називаються ефекторами III типу. Виявили, що як тільки вони виявляються в клітинах-хазяїнах, деякі ефектори TAL транскрипційно активують відповідні цільові гени хазяїна, або для вірулентності штаму (здатності викликати захворювання), або для авірулентності штаму (здатності запускати реакції стійкості в хазяїна), залежно від генетичного контексту хазяїна. Кожен ефектор містить функціональні мотиви ядерної локалізації й ефективний домен активації транскрипції, властиві еукаріотичному активатору транскрипції. І кожен ефектор також містить центральну ділянку з повторами, що складається із змінних кількостей повторюваних одиниць з 34 амінокислот, і зазначена ділянка з повторами як ДНК-сполучний домен визначає біологічну специфічність кожного ефектора.

[007] В Zhang та ін., *Plant Physiol.* 161: 20-27, 2013, яка даним повністю включена в дану заявку за допомогою посилання, описане застосування нуклеаз TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, ефекторні нуклеази, подібні до активаторів транскрипції), які являють собою сконструйовані ендонуклеази на основі комбінації подібного ефектору TAL ДНК-сполучного домена з каталітичним доменом FokI. За наявними даними, шляхом конструювання ДНК-сполучного домена такі TALEN можна легко розробити таким чином, щоб вони впізнавали певні ДНК-сполучні домени. Застосовуючи протопласти тютюну в якості модельної системи, активність TALEN оцінювали із застосуванням полінуклеотидного репортера одониткового відпалу, що містить послідовність кодуючу жовтий флуоресцентний білок, з'єднану з сайтом

впізнання TALEN. Таку репортерну систему доставляли у протопласти, і подію розщеплення та репарації можна було виміряти за експресією функціонального YFP.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[008] У першому аспекті даний винахід відноситься до способів введення опосередкованої GRON (олігонуклеосонова для репарації генів) мутації в цільову послідовність дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) у клітині рослини. Зазначені способи включають, серед іншого, культивування клітини рослини при умовах, які підсилюють один або більше процесів репарації клітинної ДНК, перед й/або одночасно з доставкою GRON у клітину рослини.

[009] У деяких варіантах реалізації умови, які підсилюють один або більше процесів репарації клітинної ДНК, включають одну або більше з наступних умов: введення в GRON або в ДНК клітини рослини одного або більше сайтів, які є мішенями для ексцизійної репарації основ, введення в GRON або в ДНК клітини рослини одного або більше сайтів, які є мішенями для негомологічного з'єднання кінців, введення в GRON або в ДНК клітини рослини одного або більше сайтів, які є мішенями для опосередкованого мікрогомолією з'єднання кінців, введення в GRON або в ДНК клітини рослини одного або більше сайтів, які є мішенями для гомологічної рекомбінації, і введення в GRON або в ДНК клітини рослини одного або більше сайтів, які є мішенями для репарації виштовхування.

[0010] У деяких варіантах реалізації цільова послідовність дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) перебуває всередині генома клітини рослини. Клітина рослини може бути нетрансгенною або трансгенною, і цільова послідовність ДНК може являти собою трансген або ендегенний ген зазначеної клітини рослини.

[0011] У деяких варіантах реалізації умови, які підсилюють один або більше процесів репарації клітинної ДНК, включають введення однієї або більше сполук, які викликають одно- або двониткові розриви ДНК, у клітину рослини перед або одночасно з доставкою GRON у клітину рослини. Приклади сполук описані далі в даній заявці.

[0012] Способи та композиції, описані в даній заявці, застосовні для рослин у цілому. Винятково як приклад, вид рослини може бути вибраний з групи, що складається з наступних видів: канола, соняшник, кукурудза, тютюн, цукровий буряк, бавовник, маїс, пшениця, ячмінь, рис, люцерна, ячмінь, сорго, томат, манго, персик, яблуко, груша, полуниця, банан, диня, картопля, морква, латук, цибуля, соя культурна, види сої, цукрова тростина, горох, нут, горох польовий, кінський біб, сочевиця, ріпа, бруква, брюссельська капуста, люпін, кольорова капуста, капуста кормова, кормові боби, тополя, сосна, евкالیпт, виноград, цитрусова рослина, тритикале, люцерна, жито, овес, дерен і кормові трави, льон, олійний рапс, гірчиця, огірок, в'юнок, бальзамін, перець, баклажан, чорнобривець, лотос, кочанна капуста, ромен, гвоздика, тюльпан, ірис і лілія. Це також може відноситись в цілому або частково до всіх інших біологічних систем, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: клітини бактерій, грибів і ссавців і навіть їх органели (наприклад, мітохондрії та хлоропласти).

[0013] У деяких варіантах реалізації зазначені способи додатково включають відтворення рослини, що містить мутацію, введену за допомогою GRON, із клітини рослини, і можуть включати збір насіння від рослини.

[0014] У відповідних аспектах даний винахід відноситься до клітин рослини, що містить геномну модифікацію, введену за допомогою GRON відповідно до способів, описаних у даній заявці, до рослини, що містить геномну модифікацію, введену за допомогою GRON відповідно до способів, описаних у даній заявці, або до насіння, що містить геномну модифікацію, введену за допомогою GRON відповідно до способів, описаних у даній заявці.

[0015] Інші варіанти реалізації даного винаходу повинні стати очевидні після ознайомлення з наступним докладним описом, типовими варіантами реалізації та формулою винаходу.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[0016] Визначення

[0017] Даний винахід варто розуміти у відповідності з наступними визначеннями.

[0018] Олігонуклеосонова являє собою полімер нуклеоснов, що може гібридизуватись шляхом спарювання основ за Уотсон-Кріком із ДНК, що має комплементарну послідовність.

[0019] Нуклеосонови включають основу, що являє собою пурин, піримідин або їхні похідні або аналоги. Нуклеосонови включають пептидні нуклеосонови, субдиниці пептидних нуклеїнових кислот і морфолінові нуклеосонови, а також нуклеозиди та нуклеотиди. Нуклеозиди являють собою нуклеосонови, які містять пентозафуранозильну групу, наприклад, можливо містять замісники рибозид або 2'-дезоксирибозид. Нуклеозиди можуть бути з'єднані однією з декількох сполучних молекул, які можуть містити або можуть не містити фосфор. Нуклеозиди, які з'єднані фосфодієфірними зв'язками, що не містять замісників, називають нуклеотидами.

[0020] Ланцюг олігонуклеоснов містить один 5'- і один 3'-кінець, які являють собою крайні

нуклеооснови полімеру. Конкретний ланцюг олігонуклеооснов може містити нуклеооснови всіх типів. Олігонуклеооснова являє собою сполуку, що містить один або більше ланцюгів олігонуклеооснов, які комплементарні та гібридизовані шляхом спарювання основ за Уотсон-Кріком. Нуклеооснови належать або до дезоксирибо-типу, або до рибо-типу. Нуклеооснови рибо-типу являють собою нуклеооснови, що містять пентозафуранозил, де 2'-атом вуглецю являє собою метилен, що містить як замісник гідроксил, алкілокси або галоген. Нуклеооснови дезоксирибо-типу являють собою нуклеооснови, відмінні від нуклеооснов рибо-типу, і включають всі нуклеооснови, які не містять пентозафуранозильну групу.

[0021] Нитка олігонуклеооснов у загальному випадку включає як ланцюг олігонуклеооснов, так і фрагменти або ділянки ланцюгів олігонуклеооснов. У нитки олігонуклеооснов є 3'-кінець та 5'-кінець. Якщо нитка олігонуклеооснов має однакову довжину з ланцюгом, то 3'- і 5'-кінці нитки також являють собою 3'- і 5'-кінці ланцюга.

[0022] Згідно з даним винаходом органи рослини включають, але не обмежені перерахованими: листя, стебла, коріння, вегетативні бруньки, квіткові бруньки, меристеми, ембріони, сім'ядолі, ендосперм, чашолистки, пелюстки, маточки, плодолистки, тичинки, пильовики, мікроспори, пилок, пилкові трубки, сім'ябруньки, зав'язі та фрукти, або зрізи, скибочки або пластинки, взяті з них. Тканини рослини включають, але не обмежені перерахованими: калусні тканини, покривні тканини, провідні тканини, запасаючі тканини, меристематичні тканини, тканини листа, тканини пагона, тканини кореня, тканини гала, тканини пухлини рослини та репродуктивних тканин. Клітини рослини включають, але не обмежені перерахованими: ізольовані клітини з клітинними стінками, їхні агрегати різного розміру та протопласти.

[0023] Два полінуклеотиди або поліпептиди ідентичні, якщо послідовність нуклеотидів або амінокислотних залишків, відповідно, у двох зазначених послідовностях однакова при вирівнюванні до максимальної відповідності, як описано нижче. Терміни "ідентичний" або "відсоток ідентичності" у контексті двох або більше нуклеїнових кислот або поліпептидних послідовностей відносяться до двох або більше послідовностей або підпослідовностей, які однакові або містять певний відсоток однакових амінокислотних залишків або нуклеотидів при порівнянні та вирівнюванні до максимальної відповідності у вікні порівняння, що вимірюють, застосовуючи один із наступних алгоритмів порівняння послідовностей або шляхом вирівнювання вручну та шляхом візуальної оцінки. Для поліпептидів, послідовності яких відрізняються на консервативні заміни, відсоток ідентичності послідовностей можна збільшити, щоб ввести виправлення на консервативну природу таких заміни. Засоби для введення таких виправлень добре відомі фахівцям у даній області. Зазвичай вони включають оцінку консервативної заміни як часткової, а не повної розбіжності, що збільшує відсоток ідентичності послідовностей. Таким чином, наприклад, коли ідентичній амінокислоті привласнюють 1 бал і не консервативній заміні привласнюють нуль балів, то консервативній заміні привласнюють бал між нулем та 1. Бали для консервативних заміни розраховують згідно, наприклад, алгоритму Meyers і Miller, Computer Applic. Biol. Sci. 4: 11-17 (1988), наприклад, що здійснюється у програмі PC/GENE (Intelligenetics, Маунтін-Вью, Каліфорнія, США).

[0024] Формулювання "по суті ідентичний" та "відсоток ідентичності" у контексті двох нуклеїнових кислот або поліпептидів відносяться до послідовностей або підпослідовностей, ідентичність нуклеотидів або амінокислотних залишків яких становить щонайменше 50 %, переважно 60 %, переважно 70 %, більш переважно 80 % і найбільше переважно 90-95 % при вирівнюванні до максимальної відповідності у вікні порівняння, що вимірюють, застосовуючи один із наступних алгоритмів порівняння послідовностей або шляхом вирівнювання вручну та візуальної оцінки. Дане визначення також відноситься до послідовності, комплементарної досліджуваній послідовності, послідовності або підпослідовності яких у значній мірі комплементарні, коли досліджувана послідовність у значній мірі ідентична еталонній послідовності.

[0025] Для фахівця в даній області техніки буде очевидно, що два поліпептиди також можуть бути "по суті ідентичними", якщо два зазначених поліпептиди імунологічно подібні. Таким чином, загальна білкова структура може бути подібною, тоді як для первинної структури двох зазначених поліпептидів демонструють істотні відмінності. Отже, спосіб вимірювання того, чи є два поліпептиди по суті ідентичними, включає вимірювання зв'язування моноклональних або поліклональних антитіл з кожним поліпептидом. Два поліпептиди по суті ідентичні, якщо антитіла, специфічні до першого поліпептиду, зв'язуються з другим поліпептидом з афінністю, рівною щонайменше одній третині від афінності до першого поліпептиду. Для порівняння послідовностей зазвичай одна послідовність виступає в ролі еталонної послідовності, з якою порівнюють досліджувані послідовності. При застосуванні алгоритму порівняння послідовностей

досліджувану й еталонну послідовності вводять у комп'ютер, встановлюють координати підпослідовностей, при необхідності, і встановлюють параметри програми алгоритму порівняння послідовностей. Алгоритм порівняння послідовностей потім розраховує відсоток ідентичності послідовностей для досліджуваної послідовності(ей) у порівнянні з еталонною послідовністю на підставі встановлених параметрів програми.

[0026] Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути здійснено, наприклад, за допомогою алгоритму локальної гомології Сміта-Ватермана, 0.4dv. Appl. Math. 2:482 (1 98 1), за допомогою алгоритму гомологічного вирівнювання Нідлмана-Вунша, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), за допомогою способу пошуку подібності Пірсона та Ліпмана, Proc. Nat'. Acad. Sci. USA 5 85:2444 (1988), за допомогою комп'ютеризованих реалізацій даних алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA й TFASTA у пакеті програмного забезпечення Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Медісон, Вісконсін), за допомогою програмного забезпечення для вирівнювання, такого як VECTOR NTI, версія 6, від InforMax, Inc., Меріленд, США, за допомогою процедур, описаних в Clustal, Thompson, J. D., Higgins, D. G. i Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680 або шляхом візуальної оцінки (див., в загальних рисах, Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel та ін., ред., Current Protocols, спільне підприємство Greene Publishing Associates, Inc., i John Wiley & Sons, Inc. (1995, Додаток) (Ausubel)).

[0027] Приклади алгоритмів, які підходять для визначення відсотка ідентичності послідовностей і подоби послідовностей, являють собою алгоритми BLAST і BLAST 2.0, які описані в Altschul та ін. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 й Altschul та ін. (1977) Nucleic Acids Res. 25:33 89-3402, відповідно. Програмне забезпечення для проведення розрахунків BLAST доступне для загального використання на сайті National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). У даному алгоритмі спочатку проводять ідентифікацію пар послідовностей з високими балами (HSP) шляхом ідентифікації коротких "слів" довжини W у запитуваній послідовності, які або збігаються, або задовольняють деякій позитивній граничній вазі (балу) T при вирівнюванні з словом такої самої довжини у послідовності з бази даних. Т називають граничним балом сусідніх слів (Altschul та ін., вище). Такі первісні збіги сусідніх слів використовують як запал для ініціації пошуку з метою виявлення утримуючих їх більш довгих HSP. Потім співпадання слів подовжують в обох напрямках уздовж кожної послідовності доти, доки може збільшуватись кумулятивна вага вирівнювання. Кумулятивні ваги для послідовностей нуклеотидів обчислюють з використанням параметрів M (призовий бал за пару співпадаючих залишків; завжди >0) і N (штрафний бал за незбіжні залишки; завжди <0). Для послідовностей амінокислот для обчислення кумулятивної ваги використовують матрицю ваг. Подовження збігів слів у кожному напрямку припиняється в тому випадку, коли: кумулятивна вага вирівнювання різко знижується на величину X від свого максимального досягнутого значення; кумулятивна вага знижується до нуля або нижче внаслідок накопичення одного або більше вирівняних залишків із негативними балами; або якщо досягається кінець кожної з послідовностей. Параметри алгоритму BLAST W, T і X визначають чутливість та швидкість вирівнювання. У програмі BLASTN (для послідовностей нуклеотидів) у якості параметрів, що задають за замовченням, використовують довжину слова (W), рівну 11, очікування (E), рівне 10, M=5, N=-4, і порівняння обох ниток. Для амінокислотних послідовностей у програмі BLASTP використають в якості параметрів, що задають за замовченням, довжину слова (W), рівну 3, очікування (E), рівне 10, і матрицю ваг BLOSUM62 (див. Henikoff і Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)). Крім обчислення відсотка ідентичності послідовностей алгоритм BLAST також здійснює статистичний аналіз подібності двох послідовностей (див., наприклад, Karlin й Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Одним із критеріїв ступеня подібності, що дозволяє одержати алгоритм BLAST, є найменша сумарна ймовірність (P(N)), що дає показник ймовірності, з якої співпадіння між двома послідовностями нуклеотидів або амінокислот може відбутися випадковим чином. Наприклад, нуклеїнову кислоту вважають подібною з еталонною послідовністю, якщо найменша сумарна ймовірність при порівнянні досліджуваної нуклеотидної послідовності з еталонною нуклеотидною послідовністю менше, ніж приблизно 0,1, більш переважно менше, ніж приблизно 0,01, і найбільше переважно менше, ніж приблизно 0,001.

[0028] Розрив ниток

[0029] Включення сполук, які викликають одно- або двониткові розриви, або всередину олігонуклеотиду, або разом із олігонуклеотидом, викликає ушкодження, що репарується за допомогою негомологічного з'єднання кінців (НГЗК), опосередкованого мікрогомолією з'єднання кінців (ОМЗК) і гомологічної рекомбінації. Як приклад, антибіотики з сімейства блеоміцину, нуклеази із цинковими пальцями, FokI (або будь-який клас ферментів рестрикції

типу IIS) і інші нуклеази можна ковалентно з'єднати з 3'- або 5'-кінцями олігонуклеотидів для репарації, щоб ввести двониткові розриви поблизу сайту, на зміну якого спрямований олігонуклеотид для репарації. Антибіотики з сімейства блеоміцину являють собою розщеплюючі ДНК глікопептиди та включають блеоміцин, зеоцин, флеоміцин, талісоміцин, пеплеоміцин та інші антибіотики.

[0030] Способи згідно з даним винаходом не обмежені природою або типом застосовуваного ДНК-модифікуючого реагенту. Наприклад, такі ДНК-модифікуючі реагенти вивільняють радикали, які призводять до розриву нитки ДНК. Як альтернатива, зазначені реагенти алкілюють ДНК із утворенням аддуктів, які будуть блокувати реплікацію та транскрипцію. В альтернативному варіанті зазначені реагенти утворюють поперечні зшивки або молекули, які інгібують клітинні ферменти, призводячи до розривів ниток. Приклади ДНК-модифікуючих реагентів, які приєднують до олігонуклеотидів для одержання утворюючих триплекс олігонуклеотидів (TFO), включають, але не обмежені перерахованими: індолюкарбазоли, нафталіндіїмід (NDI), трансплатин, блеоміцин, аналоги циклопропапіролоіндолу та фенантродигідродіоксини. Зокрема, індолюкарбазоли являють собою інгібітори топоізомери I. Інгібування даних ферментів призводить до розривів ниток й утворення аддуктів із ДНК і білками (Arimondo та ін., *Bioorganic and Medicinal Chem.* 8, 777, 2000). NDI являє собою фотоокислювач, який може окисляти гуаніни, що може викликати мутації в сайтах із залишками гуаніну (Nunez та ін., *Biochemistry*, 39, 6190, 2000). Було показано, що трансплатин реагує із ДНК у триплексній мішені, коли TFO пов'язаний із зазначеним реагентом. Дана реакція викликає утворення аддуктів ДНК, які будуть мутагенними (Columbier та ін., *Nucleic Acids Research*, 24: 4519, 1996). Блеоміцин являє собою реагент, що вносить розриви в ДНК, широко застосовуваний як аналог радіації. Його з'єднували з олігонуклеотидами та показали, що він активний як реагент, що вносить розриви в ДНК, у такому форматі (Sergeyev, *Nucleic Acids Research* 23, 4400, 1995; Kane, та ін., *Biochemistry*, 34, 16715, 1995). Аналоги циклопропапіролоіндолу з'єднували з TFO і показали, що вони алкілюють ДНК у послідовності триплексної мішені. Після цього алкілована ДНК буде містити хімічні аддукти, які будуть мутагенними (Lukhtanov, та ін., *Nucleic Acids Research*, 25, 5077, 1997). Фенантродигідродіоксини являють собою замасковані хінони, які вивільняють радикали при фотоактивації. Їх з'єднували з TFO і показали, що вони вводять розриви в дуплекс ДНК при фотоактивації (Bendinskas та ін., *Bioconjugate Chem.* 9, 555, 1998).

[0031] Одна стратегія для спрямованого порушення гена полягає в утворенні розривів одониткової або двониткової ДНК, викликаних сайтспецифічними ендонуклеазами. Ендонуклеази найбільше часто застосовують для спрямованого порушення генів в організмах, які зазвичай стійкі до більш традиційних способів спрямованого впливу на гени, таких як моделі водоростей, рослин і великих тварин, включаючи людей. Наприклад, у цей час здійснюють клінічні випробування в людини, що передбачають застосування нуклеаз із цинковими пальцями для лікування та запобігання ВІЛ-інфекції. Крім того, конструювання ендонуклеаз на сьогоднішній день застосовують при спробах порушити гени, які призводять до утворення небажаних фенотипів у зернових культурах.

[0032] Хомінг-ендонуклеази, також відомі як мегануклеази, являють собою сайт-специфічні ендонуклеази, які утворюють двониткові розриви в геномній ДНК із високим ступенем специфічності завдяки більшим (наприклад, > 14 п.о.) сайтам розщеплення. Незважаючи на те, що специфічність хомінг-ендонуклеаз до цільових сайтів дозволяє точне позиціонування індукованих розривів ДНК, сайти розщеплення хомінг-ендонуклеазами зустрічаються рідко й імовірність виявлення розщеплення, що зустрічається у природі сайту, у цільовому гені низька.

[0033] Сконструйовані хомінг-ендонуклеази одержують шляхом модифікації специфічності існуючих хомінг-ендонуклеаз. В одному підході у послідовність амінокислот хомінг-ендонуклеаз, які зустрічаються у природі вводять варіації, а потім отримані сконструйовані хомінг-ендонуклеази піддають скринінгу, щоб вибрати функціональні білки, які розщеплюють цільовий сайт зв'язування. В іншому підході химерні хомінг-ендонуклеази конструюють шляхом комбінування сайтів впізнавання двох різних хомінг-ендонуклеаз, щоб одержати новий сайт впізнавання, що складається з половин сайтів кожної хомінг-ендонуклеази.

[0034] Один клас сконструйованих ендонуклеаз являє собою клас ендонуклеаз із цинковими пальцями. В ендонуклеазах із цинковими пальцями сполучають домен неспецифічного розщеплення, зазвичай з ендонуклеази FokI, з доменами білків із цинковими пальцями, які сконструйовані таким чином, щоб вони зв'язувалися з певними послідовностями ДНК. Модульна структура ендонуклеаз із цинковими пальцями робить їх універсальною платформою для створення сайт-специфічних двониткових розривів у геномі. Одне обмеження ендонуклеаз із цинковими пальцями полягає в тому, що низька специфічність до цільового сайту або

присутність декількох цільових сайтів у геномі може призвести до випадків розщеплення поза цільовим сайтом. Тому що ендонуклеаза FokI розщеплює у вигляді димеру, одна стратегія для запобігання випадків розщеплення поза цільовим сайтом складається в розробці доменів із цинковими пальцями, які зв'язуються з суміжними сайтами з 9 пар основ.

5 [0035] TALEN являють собою направлені на мішень нуклеази, які викликають одно- і двониткові розриви у певних сайтах ДНК, які потім репаруються за допомогою механізмів, які можна застосовувати, щоб внести зміни у послідовність в сайті розщеплення.

[0036] Основний структурний елемент, що застосовують для конструювання ДНК-сполучної ділянки TALEN, являє собою домен з високо консервативним повтором, отриманий з TALE, які зустрічаються у природі, кодованих протеобактеріями виду *Xanthomonas*. TALEN зв'язує ДНК за допомогою групи високо консервативних повторів з 33 – 35 амінокислот, які фланковані додатковими отриманими з TALE доменами на аміно-кінцях і карбокси-кінцях зазначених повторів.

15 [0037] Такі повтори TALE специфічно зв'язуються з одиночною основою ДНК, що ідентифікують два гіперваріабельних залишки, зазвичай виявлених у положеннях 12 і 13 повтору, при цьому кількість повторів у групі відповідає довжині бажаної цільової нуклеїнової кислоти, конкретний повтор вибирають, щоб він підходив до цільової послідовності нуклеїнової кислоти. Розмір цільової нуклеїнової кислоти переважно становить від 15 до 20 пар основ, щоб максимізувати селективність до цільового сайту. Розщеплення цільової нуклеїнової кислоти зазвичай відбувається в межах 50 пар основ від сайту зв'язування TALEN. Комп'ютерні програми для розробки сайту впізнавання TALEN були описані в даній області техніки. Див., наприклад, Cermak та ін., *Nucleic Acids Res.* 2011., липень; 39(12): e82.

20 [0038] Після розробки TALEN таким чином, щоб вони підходили до бажаної цільової послідовності, їх можна рекомбінантно експресувати і вводити у протопласти як екзогенні білки, або експресувати з плазміди всередині протопласту.

[0039] Структура GRON і його впровадження в клітини рослини.

[0040] Рекомбінагенну олігонуклеоснову можна ввести в клітину рослини, застосовуючи будь-який спосіб, широко використовуваний у даній області, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: мікроносії (біолістичну доставку), мікрОВОлокна (нитковидні кристали), електропорацію, безпосереднє поглинання ДНК і мікроін'єкцію. Наочні приклади рекомбінагенної олігонуклеоснови описані нижче.

30 [0041] Даний винахід можна здійснити із застосуванням рекомбінагенних олігонуклеоснов, що мають конформації та хімічні склади, описані у патентах Кміес I та Кміес II, які включені в дану заявку за допомогою посилання. В Кміес I описаний спосіб внесення певних генетичних змін у цільовий ген. Рекомбінагенні олігонуклеоснови в Кміес I та/або Кміес II містять дві комплементарні нитки, одна з яких містить щонайменше один фрагмент із нуклеотидів РНК-типу ("РНК-фрагмент"), які спарені з нуклеотидами ДНК-типу іншої нитки.

[0042] В Кміес II описано, що не стосовні до нуклеотидів молекули, які містять пуринові та піримідинові основи, можна використовувати замість нуклеотидів. У патентах США під номерами 5756325; 5871984; 5760012; 5888983; 5795972; 5780296; 5945339; 6004804 і 6010907; і у міжнародному патенті номер PCT/US00/23457; і у публікаціях міжнародних патентів під номерами WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; WO 99/40789; US 6870075; і в опублікованій заявці на патент США 20030084473, зміст кожної з яких даним повністю включено в дану заявку, описані додаткові рекомбінагенні молекули, які можна застосовувати для даного винаходу. Термін "рекомбінагенна олігонуклеоснова" використовують у даному тексті для позначення молекул, які можна застосовувати в способах згідно з даним винаходом, і рекомбінагенна олігонуклеоснова включає змішані дуплексні олігонуклеотиди, молекули, що містять не стосовні до нуклеотидів молекули, описані в Кміес II, одониткові олігодезоксинуклеотиди й інші рекомбінагенні молекули, описані у перерахованих вище патентах і публікаціях патентів.

50 [0043] В одному варіанті реалізації рекомбінагенна олігонуклеоснова являє собою змішаний дуплексний олігонуклеотид, у якому нуклеотиди РНК-типу змішаного дуплексного олігонуклеотиду роблять стійкими до РНКаз шляхом заміни 2'-гідроксилу на функціональну групу фтору, хлору або броду або шляхом додавання замісника для 2'-О. Підходящі замісники включають замісники, описані в Кміес II. Альтернативні замісники включають замісники, описані у патенті США номер 5334711 (Sproat), і замісники, описані у публікаціях патентів EP 629 387 й EP 679 657 (у сукупності, Martin Applications), які включені в дану заявку за допомогою посилання. У даному тексті похідна рибонуклеотиду з 2'-фтором, хлором або бромом або рибонуклеотид, у якому 2'-ОН заміщена на замісник, описаний в Martin Applications або Sproat, називають "2'-заміщеним рибонуклеотидом". У даній заявці термін "нуклеотид РНК-типу"

означає 2'-гідроксил або 2'-заміщений нуклеотид, що з'єднаний з іншими нуклеотидами змішаного дуплексного олігонуклеотиду за допомогою фосфодієфірного зв'язку, що не містить замісники, або будь-яких із штучних засобів з'єднання, описаних в Кміес I або Кміес II. У даній заявці термін "нуклеотид дезоксирибо-типу" означає нуклеотид, що містить 2'-H, що може бути з'єднаний з іншими нуклеотидами MDON за допомогою фосфодієфірного зв'язку, що не містить замісники, або будь-якого із штучних засобів з'єднання, описаних в Кміес I або Кміес II.

[0044] В одному варіанті реалізації даного винаходу рекомбінагенна олігонуклеосонова являє собою змішаний дуплексний олігонуклеотид, що з'єднаний винятково фосфодієфірними зв'язками, що не містять замісників. В альтернативних варіантах реалізації з'єднання здійснюється за допомогою фосфодієфірів, що містять замісники, фосфодієфірних похідних і містків, не основаних на фосфорі, описаних в Кміес II. У ще одному варіанті реалізації кожний нуклеотид РНК-типу в змішаному дуплексному олігонуклеотиді являє собою 2'-заміщений нуклеотид. Особливо переважні варіанти реалізації 2'-заміщених рибонуклеотидів являють собою рибонуклеотиди, що містять як замісники 2'-фтор, 2'-метокси, 2'-пропілокси, 2'-алілокси, 2'-гідроксіетилокси, 2'-метоксіетилокси, 2'-фторпропілокси та 2'-трифторпропілокси. Більш переважні варіанти реалізації 2'-заміщених рибонуклеотидів являють собою рибонуклеотиди, що містять як замісники 2'-фтор, 2'-метокси, 2'-метоксіетилокси й 2'-алілокси. В іншому варіанті реалізації змішаний дуплексний олігонуклеотид з'єднаний з фосфодієфірними зв'язками, що не містять замісників.

[0045] Хоча змішаний дуплексний олігонуклеотид, що містить лише один тип 2'-заміщеного нуклеотиду РНК-типу, більш зручно синтезувати, способи згідно з даним винаходом можна здійснити зі змішаними дуплексними олігонуклеотидами, що містять два або більше типів нуклеотидів РНК-типу. Функція фрагмента РНК може залишитися не порушеною після переривання, викликаного впровадженням дезоксинуклеотиду між двома тринуклеотидами РНК-типу, відповідно, в обсяг терміна фрагмент РНК входить такий "перерваний фрагмент РНК". Не перерваний фрагмент РНК називають безперервним фрагментом РНК. В альтернативному варіанті реалізації фрагмент РНК може містити чередуючі стійкі до РНКзи та 2'-ОН нуклеотиди, що не містять замісники. Змішані дуплексні олігонуклеотиди переважно складаються з менше ніж 100 нуклеотидів і більш переважно з менше ніж 85 нуклеотидів, але більше ніж 50 нуклеотидів. Перша та друга нитки спарені за Уотсон-Кріком. В одному варіанті реалізації нитки змішаного дуплексного олігонуклеотиду ковалентно зв'язані за допомогою лінкера, такого як одонитковий гекса, пента або тетрануклеотид, таким чином, що перша та друга нитки є фрагментами одного олігонуклеотидного ланцюга, що містить один 3'- і один 5'-кінець. 3'- і 5'-кінці можуть бути захищені шляхом додавання "шпилькового кеп", за допомогою чого 3'- і 5'-кінцеві нуклеотиди спарені за Уотсон-Кріком із сусідніми нуклеотидами. Крім того, можна помістити другий шпильковий кеп у місце з'єднання між першою та другою нитками на відстані від 3'- і 5'-кінців, щоб стабілізувати спарювання за Уотсон-Кріком між першою та другою нитками.

[0046] Перша та друга нитки містять дві ділянки, які гомологічні двом фрагментам цільового гена ацетил-КоА карбоксилази (АККази), тобто, мають однакові послідовності з цільовим геном. Гомологічна ділянка містить нуклеотиди фрагмента РНК і може містити один або більше нуклеотидів ДНК-типу з сполучного фрагмента ДНК, а також може містити нуклеотиди ДНК-типу, які не перебувають всередині впровадженого фрагмента ДНК. Дві області гомології розділені, і кожна розташована поруч із областю, послідовність якої відрізняється від послідовності цільового гена, названої "гетерологічною ділянкою". Гетерологічна ділянка може містити один, два або три незбіжних нуклеотиди. Незбіжні нуклеотиди можуть бути безперервними або, як альтернатива можуть бути розділені одним або двома нуклеотидами, які гомологічні цільовому гену. Як альтернатива гетерологічна ділянка також може містити вставку одного, двох, трьох або п'яти або меншої кількості нуклеотидів. Як альтернатива послідовність змішаного дуплексного олігонуклеотиду може відрізнятися від послідовності цільового гена лише делецією одного, двох, трьох або п'яти або меншої кількості нуклеотидів із змішаного дуплексного олігонуклеотиду. У цьому випадку вважають, що довжина та положення гетерологічної ділянки являє собою довжину делеції, навіть якщо жодного нуклеотиду змішаного дуплексного олігонуклеотиду не перебуває всередині гетерологічної ділянки. Відстань між фрагментами цільового гена, які комплементарні двом гомологічним ділянкам, також являє собою довжину гетерологічної ділянки, коли передбачається заміна або заміни. Якщо гетерологічна ділянка містить вставку, то вона розділяє гомологічні ділянки в змішаному дуплексному олігонуклеотиді на більшу відстань, ніж їх комплементарні гомологічні фрагменти перебувають у гені, і зворотне справедливо, коли гетерологічна ділянка кодує делецію.

[0047] Кожний з фрагментів РНК змішаних дуплексних олігонуклеотидів є частиною

гомологічної ділянки, тобто, ділянки послідовності, що ідентична фрагменту цільового гена, і дані фрагменти РНК спільно переважно містять щонайменше 13 нуклеотидів РНК-типу, і переважно від 16 до 25 нуклеотидів РНК-типу, або ще більш переважно 18-22 нуклеотиди РНК-типу, або найбільше переважно 20 нуклеотидів. В одному варіанті реалізації фрагменти РНК

5 гомологічних ділянок розділені та розташовані поруч, тобто, "з'єднані" впровадженням фрагментом ДНК. В одному варіанті реалізації кожний нуклеотид гетерологічної ділянки являє собою нуклеотид впровадженого фрагмента ДНК. Впроваджений фрагмент ДНК, що містить гетерологічну ділянку змішаного дуплексного олігонуклеотиду, називають "мутаторним фрагментом"

10 [0048] Заміна, яку потрібно ввести в цільовий ген, кодується гетерологічною ділянкою. Заміна, яку потрібно ввести в ген, може являти собою заміну однієї або більше основ послідовності гена, що заміняє нативну амінокислоту в даному положенні на бажану амінокислоту.

[0049] В іншому варіанті реалізації даного винаходу рекомбінагенні олігонуклеосонова являє собою односторонній олігодезоксинуклеотидний мутаційний вектор, або SSOMV, що описаний у міжнародній заявці на патент PCT/US00/23457, що повністю включена в дану заявку за допомогою посилання. Послідовність SSOMV заснована на тих самих принципах, що й мутаційні вектори, описані у патентах США під номерами 5756325; 5871984; 5760012; 5888983; 5795972; 5780296; 5945339; 6004804 і 6010907 й у міжнародних публікаціях під номерами WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; WO 99/40789; в US 6870075 і в опублікованій заявці на патент США 20030084473. Послідовність SSOMV містить дві ділянки, які гомологічні цільовій послідовності, розділені ділянкою, що містить бажані генетичні зміни, названою мутаторною ділянкою. Послідовність мутаторної ділянки може мати ту саму довжину, що й послідовність, яка розділяє гомологічні ділянки в цільовій послідовності, але має іншу

20 послідовність. Така мутаторна ділянка буде викликати заміну.

[0050] Нуклеотиди SSOMV являють собою дезоксирибонуклеотиди, які з'єднані немодифікованими фосфодієфірними зв'язками за винятком того, що 3'-кінцевий та/або 5'-кінцевий міжнуклеотидні зв'язки або, як альтернатива дві 3'-кінцеві та/або 5'-кінцеві міжнуклеотидні зв'язки можуть являти собою фосфоротіоат або фосфороамідат. У даній заявці міжнуклеотидний зв'язок являє собою зв'язок між нуклеотидами SSOMV і не включає зв'язок між 3'-кінцем нуклеотиду або 5'-кінцем нуклеотиду та блокуючим замісником, дивись вище. У конкретному варіанті реалізації довжина SSOMV становить 21 – 55 дезоксинуклеотидів, і загальна довжина ділянок гомології, відповідно, становить щонайменше 20 дезоксинуклеотидів, і довжина кожної з щонайменше двох ділянок гомології повинна становити щонайменше 8

35 дезоксинуклеотидів.

[0051] SSOMV може бути сконструйований таким чином, щоб він був комплементарним або кодуєчій нитці або не кодуєчій нитці, цільового гена. Якщо бажана мутація являє собою заміну однієї основи, переважно, щоб обидва мутаторних нуклеотиди, являли собою піримідин. У тих випадках, коли це відповідає досягненню необхідного функціонального результату, переважно, щоб як мутаторний нуклеотид, так і націлений нуклеотид у комплементарній нитці являли собою піримідини. Особливо переважними є SSOMV, які кодують трансверсійні мутації, тобто мутаторний нуклеотид С або Т не сполучений, відповідно, з нуклеотидом С або Т у комплементарній нитці.

40

[0052] На додаток до олігодезоксинуклеотиду SSOMV може містити 5'- замісник, блокуючий замісник, що приєднаний до 5'-кінцевих атомів вуглецю за допомогою лінкеру. Хімічна природа лінкеру не є критичною, на відміну від його довжини, що переважно повинна становити щонайменше 6 атомів, і сам лінкер повинен бути гнучким. Можна застосовувати різні нетоксичні замісники, такі як біотин, холестерин або інші стероїди або неінтеркалюючий катіонний флуоресцентний барвник. Особливо переважними як реагенти для одержання SSOMV є реагенти під торговельними найменуваннями Cy3TM та Cy5TM в Glen Research (тепер GE Healthcare), Стерлінг, Вірджінія, які являють собою блоковані фосфорамідити, які при включенні в олігонуклеотид дозволяють одержати 3,3,3',3'-тетраметил-N, N'-ізопропіл, що містить як замісники індомонокарбоціаніновий та індодикарбоціаніновий барвники, відповідно. Cy3 є найбільш переважним. Якщо індокарбоціанін містить як замісник N-оксіалкіл, його можна зручно з'єднати з 5'-кінцем олігодезоксинуклеотиду за допомогою фосфодієфіру з 5'-кінцевим фосфатом. Хімічний склад лінкеру між барвником та олігодезоксинуклеотидом не є критичним, і його вибирають для зручності синтезу. Якщо використовують доступний для придбання фосфорамідит Cy3, як зазначено, то отримана 5'-модифікація складається з блокуючого замісника, і лінкера разом, які являють собою N-гідроксипропіл, N'-фосфатидилпропіл, 3,3,3',3'-тетраметил- індомонокарбоціанін.

50

55

60

[0053] У переважному варіанті реалізації індокарбоціаніновий барвник є тетра-заміщеним у 3- і 3'- положеннях індольних кілець. Без обмеження теорією такі замісники не дозволяють барвнику бути інтеркалюючим барвником. Вид замісників у даних положеннях не є критичним. SSOMV може додатково містити 3'- блокуючий замісник. Крім того, хімічний склад 3'- блокуючі замісники, не є критичним.

[0054] В іншому переважному варіанті реалізації рекомбінагенний олігонуклеотид являє собою одноланцюговий олігодезоксинуклеотид, що містить 3'-кінцевий нуклеотид, 5'-кінцевий нуклеотид, довжина якого становить щонайменше 25 дезоксинуклеотидів і не більше ніж 65 дезоксинуклеотидів, і має послідовність, що містить щонайменше дві ділянки, кожна з яких складається з щонайменше 8 дезоксинуклеотидів, відповідно, ідентичних щонайменше двом ділянкам цільового хромосомного гена, при цьому сукупна довжина даних ділянок становить щонайменше 24 нуклеотиди, і дані ділянки розділені щонайменше одним нуклеотидом у послідовності цільового хромосомного гена, або у послідовності олігодезоксинуклеотиду, або обох, таким чином, що послідовність олігодезоксинуклеотиду не ідентична послідовності цільового хромосомного гена. Див. патент США 6271360, який включений у дану заявку за допомогою посилання.

[0055] Мікроносії та мікрОВОлокна.

[0056] Застосування металевих мікроносіїв (мікросфер) для впровадження більших фрагментів ДНК у клітини рослини, що мають целюлозні клітинні стінки, шляхом метального проникнення (далі називаного біолістичною доставкою) добре відомі фахівцям у відповідній області. У патентах США під номерами 4945050; 5100792 і 5204253 описані основні методики вибору мікроносіїв і пристроїв для їхнього проектування. У патентах США під номерами 5484956 і 5489520 описане одержання родючої трансгенної кукурудзи із застосуванням бомбардування мікрочастинками калусної тканини кукурудзи. Біолістичні методики також застосовують для трансформації незрілих ембріонів кукурудзи.

[0057] Конкретні умови застосування мікроносіїв у способах згідно з даним винаходом розкриті у міжнародній публікації WO 99/07865. У типовій методиці крижані мікроносії (60 мг/мл), змішаний дуплексний олігонуклеотид (60 мг/мл), 2,5 М CaCl₂ й 0,1 М спермідин додають у зазначеному порядку; суміш обережно перемішують, наприклад за допомогою струшування, протягом 10 хвилин і залишають при кімнатній температурі на 10 хвилин, після чого мікроносії розбавляють 5 об'ємами етанолу, центрифугують та перерозчиняють в 100 % етанолі. Гарні результати можна одержати для концентрації в адгезивному розчині 8-10 мкг/мкл мікроносіїв, 14-17 мкг/мкл змішаного дуплексного олігонуклеотиду, 1,1-1,4 М CaCl₂ і 18-22 мМ спермідину. Оптимальні результати спостерігали при умовах, що включають 8 мкг/мкл мікроносіїв, 16,5 мкг/мкл змішаного дуплексного олігонуклеотиду, 1,3 М CaCl₂ і 21 мМ спермідину.

[0058] Рекомбінагенні олігонуклеосооснови також можна впровадити в клітини рослини для здійснення даного винаходу, застосовуючи мікрОВОлокна для проникнення через клітинну стінку та клітинну мембрану. У патенті США номер 5302523, Coffee та ін., описане застосування волокон карбіду кремнію 30 × 0,5 мкм і 10 × 0,3 мкм для полегшення трансформації суспензійних культур кукурудзи Black Mexican Sweet. Будь-який механічний спосіб, який можна застосовувати для введення ДНК із метою трансформації клітини рослини із застосуванням мікрОВОлокна, можна використовувати для доставки рекомбінагенних олігонуклеосооснов, щоб застосовувати їх для одержання розглянутих мутантів Аккази. Наочний спосіб мікрОВОлоконної доставки рекомбінагенної олігонуклеосооснови описаний далі. Стерильні мікрОВОлокна (2 мкг) суспендують в 150 мкл рослинного культурального середовища, що містить приблизно 10 мкг змішаного дуплексного олігонуклеотиду. Суспензійній культурі дають можливість відстоятись, і рівні об'єми ущільнених клітин і стерильної суспензії волокно/нуклеотид струшують на вортексі протягом 10 хвилин і висівають. Селективні середовища вносять відразу ж або із затримкою аж до приблизно 120 годин, у міру доцільності для конкретної властивості.

[0059] Електропорація.

[0060] В альтернативному варіанті реалізації рекомбінагенні олігонуклеосооснови можна доставляти в клітину рослини шляхом електропорації протопласту, отриманого з частини рослини відповідно до методик, які добре відомі середньому фахівцю в даній області. Див., наприклад, Gallois та ін., 1996, в Methods in Molecular Biology 55:89-107, Humana Press, Тотова, Нью-Джерсі; Kipp та ін., 1999, в Methods in Molecular Biology 133:213-221, Humana Press, Тотова, Нью-Джерсі.

[0061] Рекомбінагенні олігонуклеосооснови також можна ввести в мікроспори шляхом електропорації. Після вивільнення тетради мікроспора стає однопольною й тонкостінною. Вона починає збільшуватися та розвиває зародкову пору перед утворенням екзини. Мікроспора на даній стадії потенційно більш сприйнятлива до трансформації екзогенної ДНК, ніж інші клітини

рослини. Крім того, розвиток мікроспори можна змінювати *in vitro*, щоб одержати або гаплоїдні ембріони, або ембріогенний калус, з якого можна відтворити рослини (Coumans та ін., Plant Cell Rep. 7:618-621, 1989; Datta та ін., Plant Sci. 67:83-88, 1990; Maheshwari та ін., Am. J. Bot. 69:865-879, 1982; Schaeffer, Adv. In Cell Culture 7:161-182, 1989; Swanson та ін., Plant Cell Rep. 6:94-97, 1987). Таким чином, із трансформованих мікроспор можна відтворити безпосередньо гаплоїдні рослини або дигаплоїдні родючі рослини після подвоєння хромосоми за допомогою стандартних способів. Див. також заявку США, що перебуває на одночасному розгляді, серійний номер 09/680858, названу Compositions and Methods for Plant Genetic Modification, зміст якої включено в дану заявку за допомогою посилання.

[0062] Способи електропорації мікроспор описані в Jardinaud та ін., Plant Sci. 93:177-184, 1993, і Fennell і Hauptman, Plant Cell Reports 11:567-570, 1992. Способи електропорації протопластів рослини MDON також можна пристосувати для застосування для електропорації мікроспор.

[0063] Нитковидні кристали та мікроін'єкція.

[0064] У ще одному альтернативному варіанті реалізації рекомбінагенну олігонуклеоснову можна доставити в клітину рослини за допомогою нитковидних кристалів або шляхом мікроін'єкції в зазначену клітину рослини. Так названу методику нитковидних кристалів здійснюють по суті як описано у Frame та ін., 1994, Plant J. 6:941-948. Рекомбінагенну олігонуклеоснову додають до нитковидних кристалів і використовують для трансформації клітин рослини. Рекомбінагенну олігонуклеоснову можна інкубувати разом із плазмідами, що містять послідовності, кодуєчі білки, здатні утворювати комплекси з рекомбіназою у клітинах рослини, таким чином, що каталізується рекомбінація між зазначеним олігонуклеотидом і цільовою послідовністю.

[0065] Селекція рослин

[0066] У різних варіантах реалізації рослини, описані в даній заявці, можуть бути будь-якого виду з двочасткових, однодольних або голонасінних рослин, включаючи будь-які види деревних рослин, які ростуть як дерево або чагарник, будь-які трав'яні види або будь-які види, які дають їстівні фрукти, насіння або овочі, або будь-які види, які дають яскраві або ароматні квіти. Наприклад, рослину можна вибрати з групи, що складається з наступних видів рослин: канولا, соняшник, кукурудза, тютюн, цукровий буряк, бавовник, маїс, пшениця, ячмінь, рис, люцерна, ячмінь, сорго, томат, манго, персик, яблуко, груша, полуниця, банан, диня, картопля, морква, латук, цибуля, соя культурна, види сої, цукрова тростина, горох, нут, горох польовий, кінський біб, сочевиця, ріпа, бруква, брюссельська капуста, люпін, кольорова капуста, капуста кормова, кормові боби, тополя, сосна, евкаліпт, виноград, цитрусова рослина, тритікале, люцерна, жито, овес, дерен і кормові трави, льон, олійний рапс, гірчиця, огірок, в'юнок, бальзамін, перець, баклажан, чорнобривець, лотос, кочанна капуста, ромен, гвоздика, тюльпан, ірис, лілія, і рослини, що дають горіхи, якщо вони ще конкретно не згадані.

[0067] Можна досліджувати стійкість або толерантність до гербіциду рослин і клітин рослин, застосовуючи широко відомі в даній області техніки способи, наприклад, шляхом вирощування рослини або клітини рослини у присутності гербіциду та вимірюванні швидкості росту в порівнянні з швидкістю росту під час відсутності гербіциду.

[0068] У даному тексті по суті нормальний ріст рослини, органу рослини, тканини рослини або клітини рослини визначають як швидкість росту або швидкість розподілу клітин рослини, органу рослини, тканини рослини або клітини рослини, що становить щонайменше 35 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 % або щонайменше 75 % від швидкості росту або швидкості розподілу клітини відповідної рослини, органу рослини, тканини рослини або клітини рослини, експресуючої білок AHAS дикого типу.

[0069] У даній заявці по суті нормальний розвиток рослини, органу рослини, тканини рослини або клітини рослини визначають як походження одного або більше подій розвитку в рослині, органі рослини, тканині рослини або клітині рослини, що по суті однаково з таким, що відбувається у відповідній рослині, органі рослини, тканини рослини або клітині рослини, експресуючій зазначений білок дикого типу.

[0070] У деяких варіантах реалізації органи рослини, представлені в даній заявці, включають, але не обмежені перерахованими: листя, стебла, коріння, вегетативні бруньки, квіткові бруньки, меристеми, ембріони, сім'ядолі, ендосперм, чашолистки, пелюстки, маточки, плодолистки, тичинки, пильовики, мікроспори, пилок, пилкові трубки, сім'ябруньки, зав'язі та фрукти, або зрізи, скибочки або пластинки, взяті з них. Тканини рослини включають, але не обмежені перерахованими: калусні тканини, покривні тканини, провідні тканини, запасуючі тканини, меристематичні тканини, тканини листа, тканини пагона, тканини кореня, тканини гала, тканини пухлини рослини та репродуктивних тканин. Клітини рослини включають, але не

обмежені перерахованими: ізольовані клітини з клітинними стінками, їхні агрегати різного розміру та протопласти.

[0071] Рослини є по суті "толерантними" до відповідного гербіциду, коли їх піддають його впливу й одержують криву дозової залежності, що зрушена вправо у порівнянні з такою, отриманою для аналогічним чином підданого впливу даного гербіциду нетолерантної подібної рослини. Для таких кривих дозової залежності "доза" нанесена на графік на вісь x та "відсоток убитих", "гербіцидна дія" і так далі, нанесено на графік на вісь y. Для толерантних рослин буде потрібно більше гербіциду, ніж для нетолерантних подібних рослин, щоб одержати дану гербіцидну дію. Рослини, які по суті "стійкі" до гербіциду, проявляють трохи, якщо взагалі проявляють, некротичних, літичних, хлоротичних або інших ушкоджень, коли їх піддають впливу гербіциду при концентраціях й інтенсивності, які зазвичай використовують в агрохімічному співтоваристві, щоб убити бур'яни у полі. Рослини, які стійкі до гербіциду, також толерантні до гербіциду.

[0072] Одержання рослин.

[0073] Відомі способи культивування різних тканин різних видів рослини та регенерації рослин із них. Наприклад, наощування культурного сорту каноли в культурі тканини описане у будь-якому з наступних джерел, але не обмежене будь-якими з перерахованих далі джерел: Chuong та ін., "A Simple Culture Method for Brassica hypocotyls Protoplasts", Plant Cell Reports 4:4-6, 1985; Barsby, T. L., та ін., "A Rapid and Effective Alternative Procedure for the Regeneration of Plants from Hypocotyl Protoplasts of Brassica napus", Plant Cell Reports (Spring, 1996); Kartha, K., та ін., "In vitro Plant Formation from Stem Explants of Rape", Physiol. Plant, 31:217-220, 1974; Narasimhulu, S., та ін., "Species Specific Shoot Regeneration Response of Cotyledonary Explants of Brassicas", Plant Cell Reports (Spring 1988); Swanson, E., "Microspore Culture in Brassica", Methods in Molecular Biology, том 6, розділ 17, стор. 159, 1990.

[0074] Подальше розмноження сорту може відбуватися в культурі тканини та шляхом регенерації. Культивування різних тканин сої та регенерація рослин з них добре відомі й опубліковані у багатьох джерелах. Наприклад, можна послатися на наступні джерела: Komatsuda, T. та ін., "Genotype X Sucrose Interactions for Somatic Embryogenesis in Soybeans", Crop Sci. 31:333-337, 1991; Stephens, P. A., та ін., "Agronomic Evaluation of Tissue-Culture-Derived Soybean Plants", Theor. Appl. Genet. 82:633-635, 1991; Komatsuda, T. та ін., "Maturation and Germination of Somatic Embryos as Affected by Sucrose and Plant Growth Regulators in Soybeans Glycine gracilis Skvortz and Glycine max (L.) Merr.", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 28:103-113, 1992; Dhir, S. та ін., "Regeneration of Fertile Plants from Protoplasts of Soybean (Glycine max L. Merr.); Genotypic Differences in Culture Response", Plant Cell Reports 11:285-289, 1992; Pandey, P. та ін., "Plant Regeneration from Leaf and Hypocotyl Explants of Glycine wightii (W. and A.) VERDC. var. longicauda", Japan J. Breed. 42:1-5, 1992; i Shetty, K., та ін., "Stimulation of In Vitro Shoot Organogenesis in Glycine max (Merrill.) by Allantoin and Amides", Plant Science 81:245-251, 1992. Описи патенту США номер 5024944, виданого 18 червня 1991 р., автори Collins та ін., і патенту США номер 5008200, виданого 16 квітня 1991 р., автори Ranch та ін., даним повністю включені в дану заявку за допомогою посилання.

[0075] У наступних прикладах проілюстроване здійснення даного винаходу, але вони не повинні тлумачитись як обмежуючий об'єм даного винаходу.

[0076] Приклад 1. Істотно поліпшене перетворення гена синього флуоресцентного білка (BFP) у трансгенних клітинах Arabidopsis thaliana у зелений флуоресцентний білок (GFP) шляхом введення спрямованої одонуклеотидної мутації за допомогою олігонуклеотидів для репарації генів (GRON) у комбінації з парою ефекторних нуклеаз, подібних до активаторів транскрипції (TALEN), які водять розрив поруч із сайтом заміни цільової основи.

[0077] Одержували лінію Arabidopsis з декількома копіями гена синього флуоресцентного білка за допомогою способів, відомих фахівцям у даній області (див., наприклад, Clough i Brent, 1998). З кореня даної лінії одержували меристематичні культури тканини, які застосовували для виділення та культивування протопластів (див., наприклад, Mathur та ін., 1995). Доставки GRON у протопласти домагалися шляхом опосередкованого поліетиленгліколем (ПЕГ) поглинання GRON протопластами. Застосовували спосіб з використанням 96-ямкового формату, аналогічний такому, описаному в Fujiwara та Kato (2007). Протокол коротенько описаний далі. Наведені об'єми відповідають об'ємам, що додають в окремі ямки 96-ямкового планшета.

1. Змішували 6,25 мкл суміші GRON/TALEN (80 мкМ BFP4 Coding/41 мер GRON) з 25 мкл протопластів, отриманих із меристематичної тканини трансгенного за BFP кореня Arabidopsis, при концентрації 5×10^6 клітин/мл у кожній ямці 96-ямкового планшета.

2. Додавали 31,25 мкл 40 % розчину ПЕГ і перемішували протопласти.

3. Оброблені клітини інкубували на льоді протягом 30 хв.

4. У кожну ямку додавали 200 мкл розчину W5 і перемішували клітини.
 5. Планшети залишали для інкубації на льоді протягом 30 хв, дозволяючи протопластам осісти на дно кожної ямки.

6. Видаляли 200 мкл середовища над осілими протопластами.

5 7. Додавали 85 мкл культурального середовища (MSAP, див. Mathur та ін., 1995).

8. Планшети інкубували при кімнатній температурі в темряві протягом 48 годин. Кінцева концентрація GRON після додавання культурального середовища становила 8 мкм.

% протопластів із зеленою флуоресценцією

10 [0078] Застосовуючи даний протокол вводили плазмиди TALEN при різних концентраціях разом із GRON. Через сорок вісім годин після доставки GRON зразки аналізували за допомогою проточної цитометрії для того, щоб виявити протопласти, зелена та жовта флуоресценція яких відрізняється від такої в контрольних протопластів. Зелена флуоресценція викликала введенням спрямованої мутації в ген BFP, що призводило до синтезу GFP. Результати показані на фігурі 1.

15 Концентрація плазмиди TALEN (мкМ)

[0079] Фігура 1. Протопласти, отримані з меристематичної тканини кореня, обробляли плазмідами TALEN при різних концентраціях разом із GRON, що викликає спрямовану мутацію в гені BFP, що призводить до його перетворення в ген GFP. Експресію GFP вимірювали за допомогою проточної цитометрії через 48 год. після доставки GRON/TALEN.

20 [0080] Для всіх наведених нижче прикладів 2-11 справедливий наступний опис:

[0081] GRON

[0082] Розробка направленої перетворення BFP→GFP.

BFP→GFP H66Y CAC→TAC.

BFP4/C/41/5'-Cy3/3'-idC

25 VCCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCH

BFP4/NC/41/5'-Cy3/3'-idC

VGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAAGGTGGTCACGAGGGH

[0083] Розробка не направленої на BFP контролю.

BFP H66-CAC

30 BFP0/C/41/5'-3PS/3'-3PS

VCCCTCGTGACCACCTTCACCCACGGCGTGCAGTGCTTCAGCH

BFP0/NC/41/5'-3PS/3'-3PS

VGCTGAAGCACTGCACGCCGTGGGTGAAGGTGGTCACGAGGGH

ДНК- сполучний домен ефектору TAL

35 [0084] TALEN:

ДНК- сполучний домен ефектору TAL

TALEN:

ДНК- сполучний домен

ефектору TAL



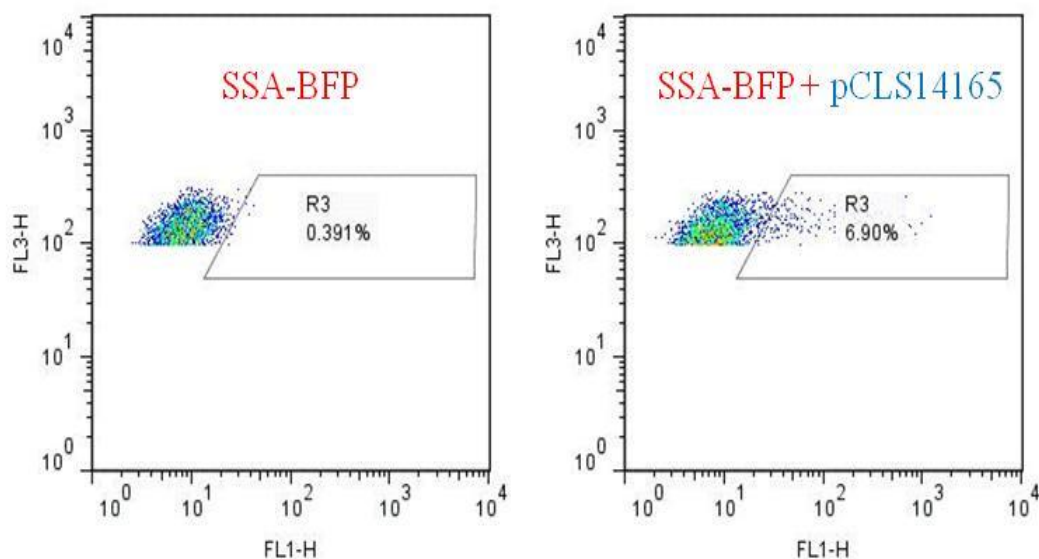
CTTCATGTGGTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTGGGTGAAGGTGGTCACGAGGGTGGCCAGGGCACGGG
 GAAGTACACCAGCCCCATCGCCGACTTCGTGACGTGCGGCACCCACTTCCACCAGTGCTCCCAACCGGTCCCGTGCCC
 K M H D P Y R S F C Q V G H T F T T V L T P W P V P



ДНК- сполучний домен

ефектору TAL

40 [0085] pCLS14165 містить обидва плеча TAL на одній плазміді (розробленої відповідно до Zhang та ін., 2013), при цьому кожне плече зв'язується з підкресленою послідовністю та з'єднано з мономером FokI. Така комбінація призводить до утворення двониткового розриву (ДНР), як показано нижче в аналізі однострессового відпау (SSA), здійсненому таким самим способом, що описаний в Zhang та ін. (2013).



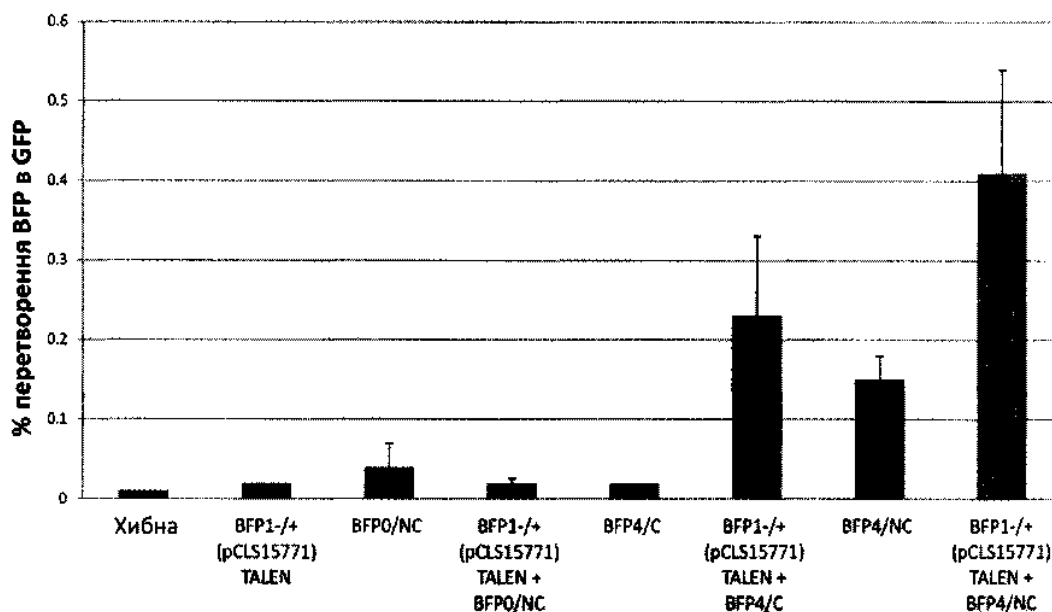
[0086] pCLS15771 являє собою ніказу з мутацією (D450A) в домені FokI для лівого плеча. Праве плече в даній конструкції відповідає такому в pCLS14165.

[0087] pCLS15769 являє собою ніказу з мутацією (D450A) в домені FokI для правого плеча. 5 Ліве плече в даній конструкції відповідає такому в pCLS14165.

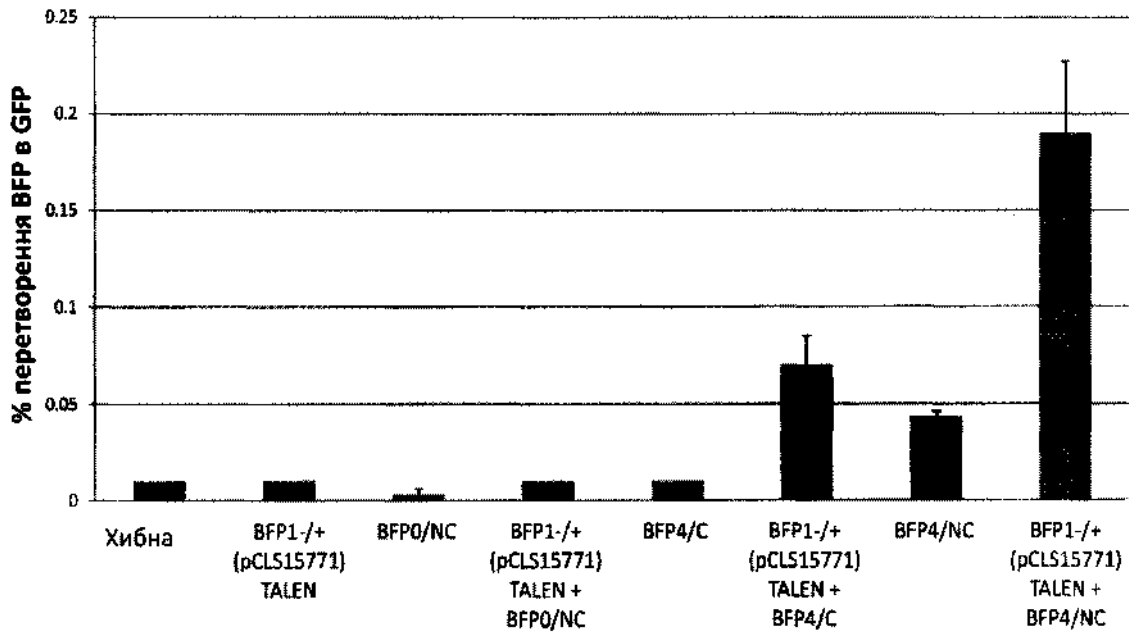
[0088] GRON і TALEN тестували, як показано нижче. Контрольні обробки, що складаються з ненаправлених GRON (BFP0/C або BFP0/NC) і TALEN окремо, а також помилкових обробок 40 % розчином ПЕГ, у якому немає GRON або плазмиди TALEN, не проявляли істотної трансформуючої активності.

10 [0089] У даній системі конструкція BFP4/NC GRON окремо виявилася краще, ніж конструкція BFP4/C GRON окремо. Комбінування даних конструкцій з ДНП TALEN (pCLS14165) поліпшувало обидві, при цьому найбільшу активність та кратність поліпшення (у багатьох випадках > 2 порядків величини) спостерігали для BFP4/C GRON. Значне поліпшення також спостерігали при комбінуванні GRON з парами ніказ TALEN, і очікували, що воно найбільш корисно завдяки 15 мінімізації побічного ефекту, коли мутації направлені на декілька генів/ локусів/ алелей одночасно.

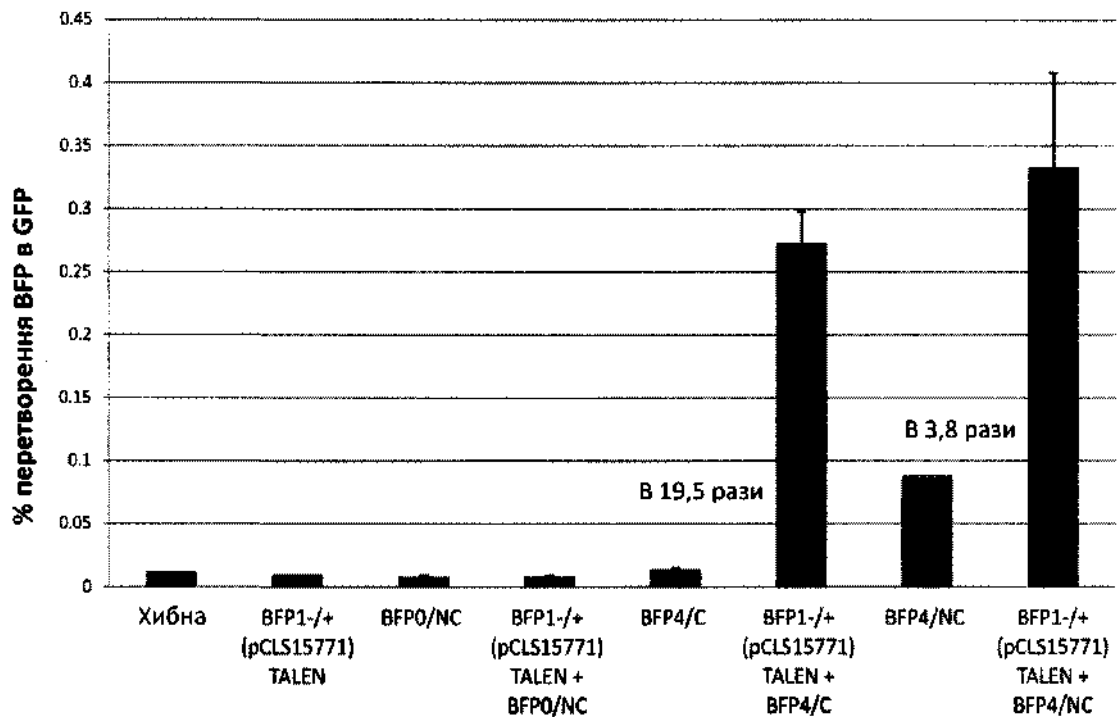
[0090] Приклад 2: GRON плюс ніказа TALEN.



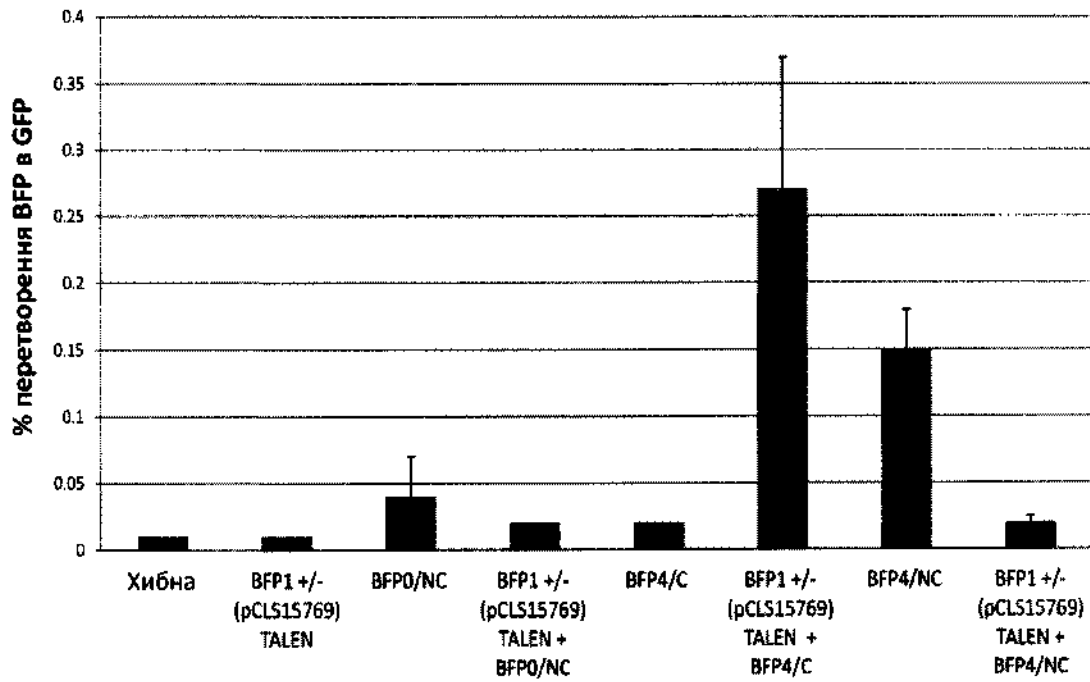
[0091] Приклад 3: GRON плюс ніказа TALEN.



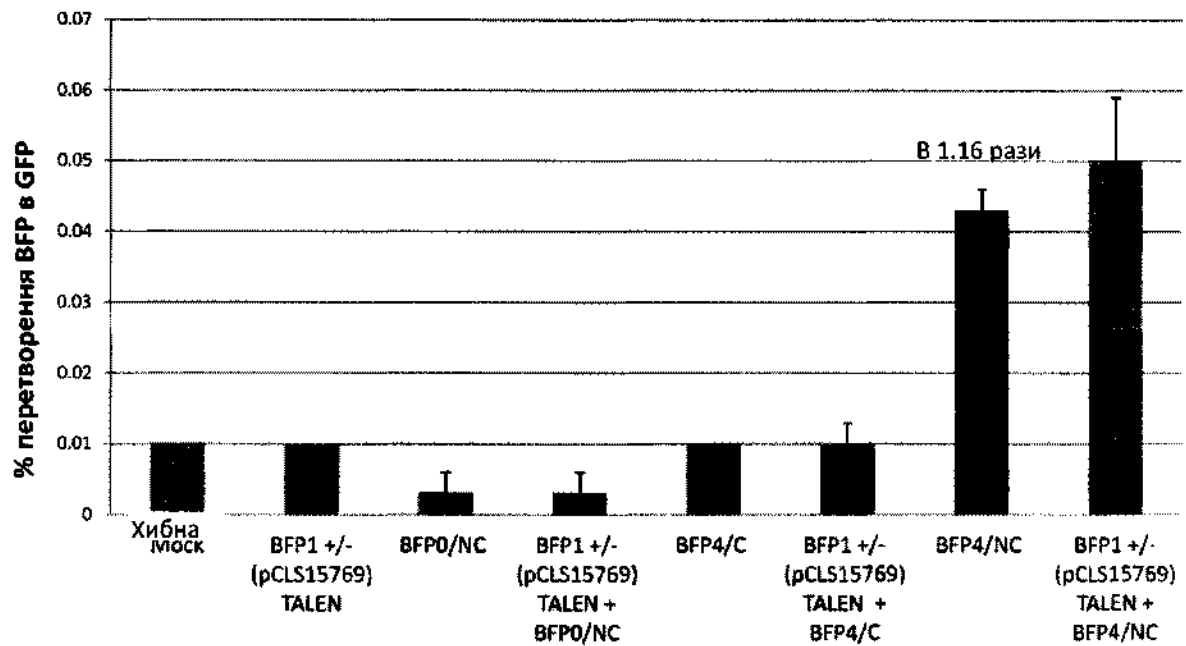
[0092] Приклад 4: GRON плюс ніказа TALEN.



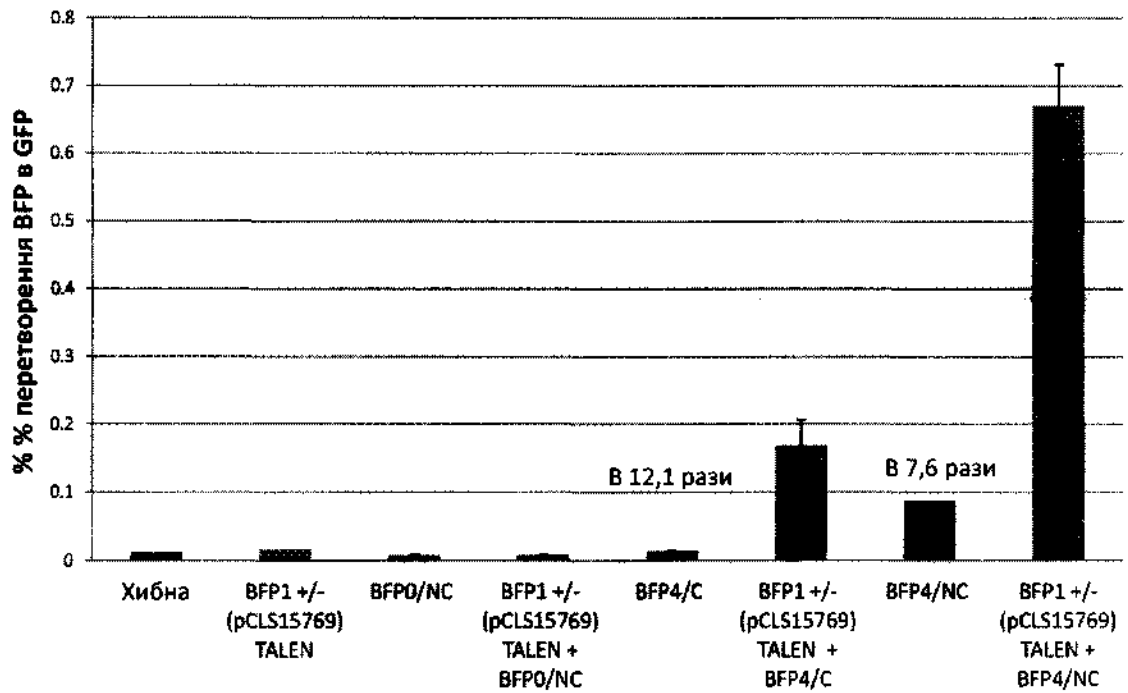
[0093] **Приклад 5:** GRON плюс ніказ TALEN.



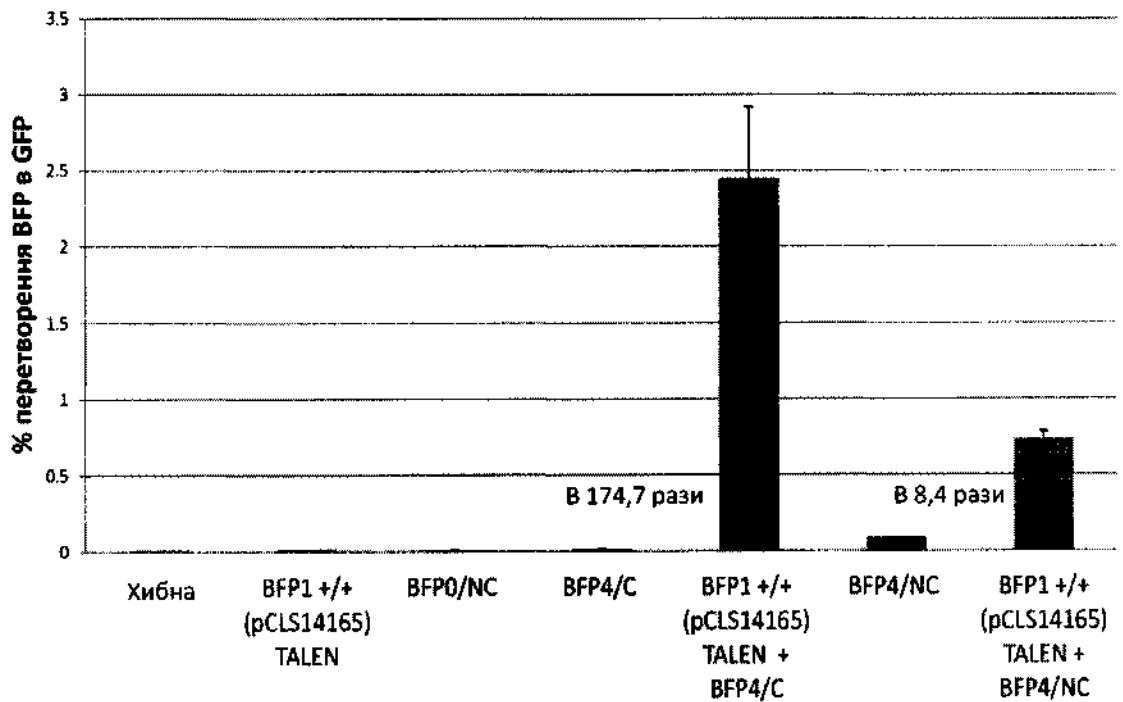
[0094] **Приклад 6:** GRON плюс ніказ TALEN.



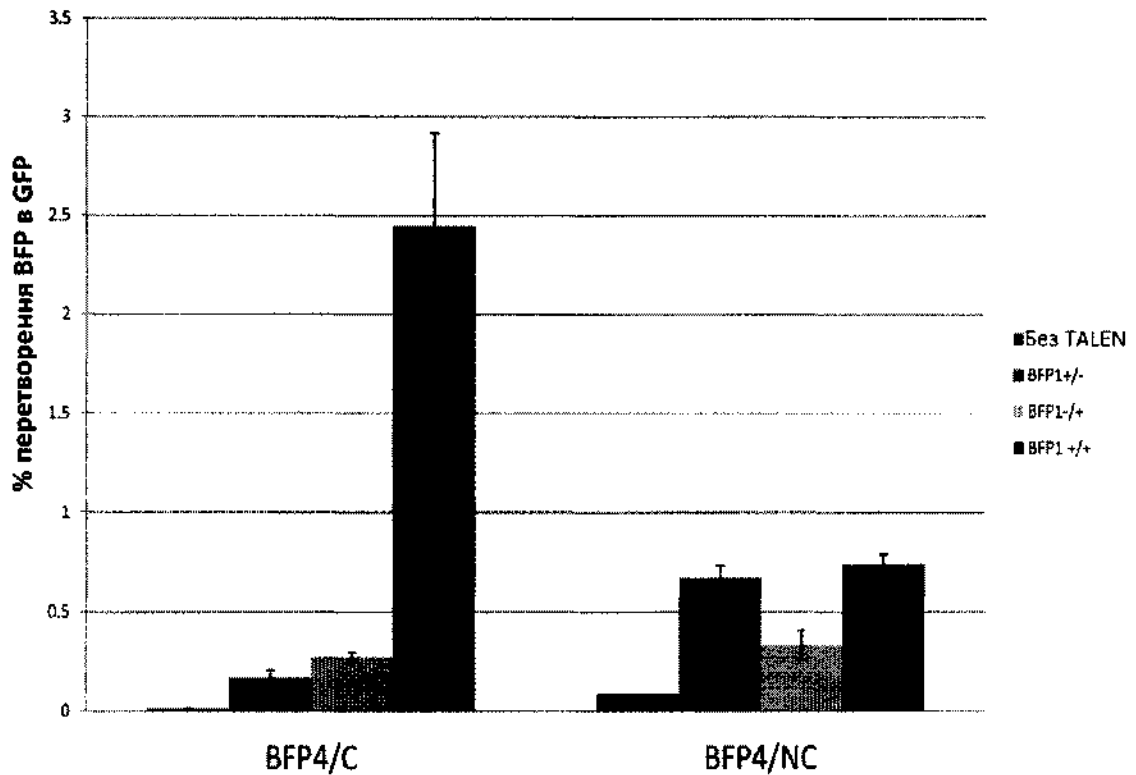
[0095] **Приклад 7:** GRON плюс ніказа TALEN.



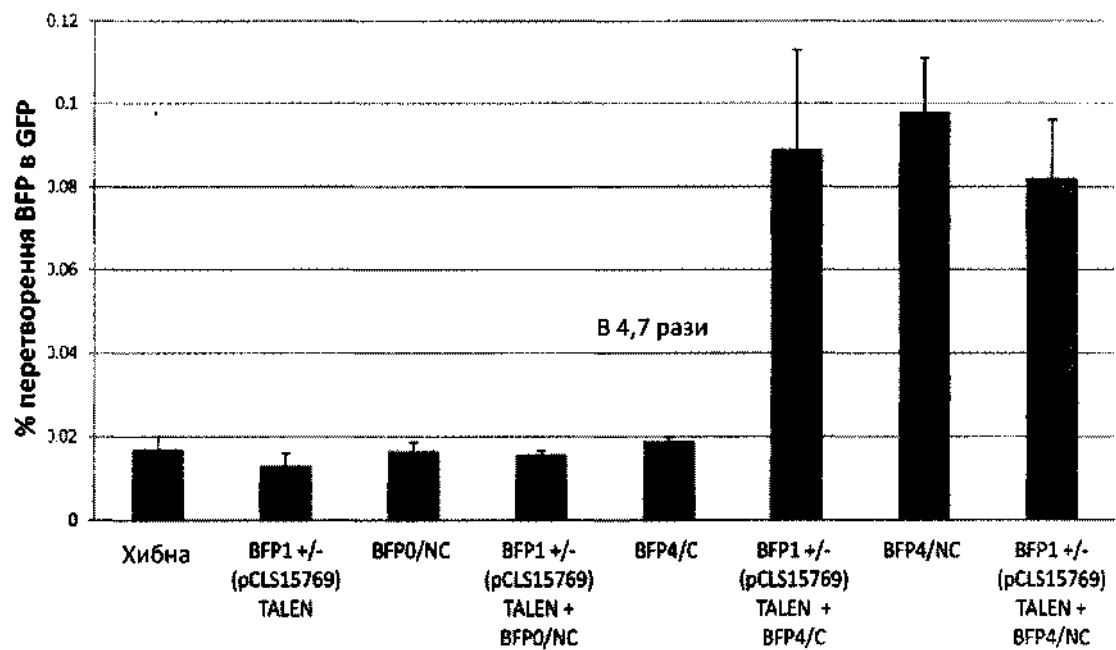
[0096] **Приклад 8:** GRON плюс ДНР TALEN.

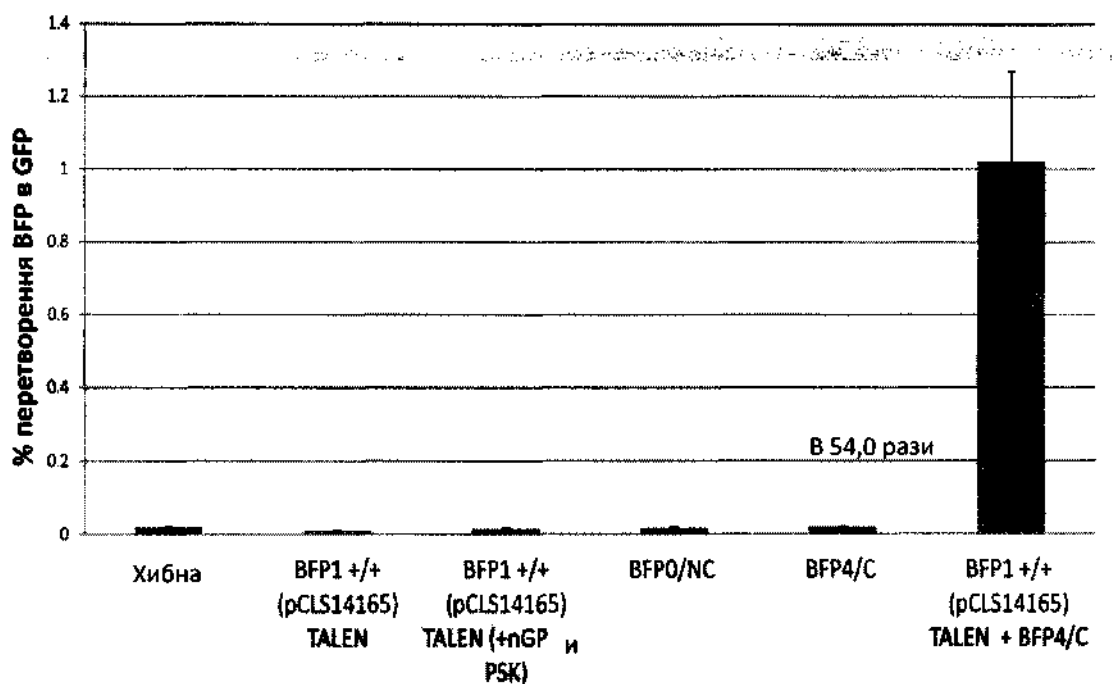


[0097] **Приклад 9:** GRON плюс TALEN.



[0098] **Приклад 10:** GRON плюс ніказа TALEN.



[0099] **Приклад 11: GRON плюс ДНР TALEN.**

[00100] Посилання

[00101] Clough, S.J., i Bent, A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16, 735-743.5 [00102] Mathur, J., Szabados, L, i Koncz, C. (1995) A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. Plant Cell Rep. 14, 221-226[00103] Fujikawa Y, Kato N (2007) Split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in *Arabidopsis* protoplasts. Plant J 52: 185-195

10 [00104] Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF. (2013) Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. Plant Physiol. 161(1):20-7.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> CIBUS US LLC
CIBUS EUROPE B.V.

<120> СПОСОБИ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ СПРЯМОВАНОЇ
МОДИФІКАЦІЇ ГЕНІВ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ОЛІГОНУКЛЕОТИДАМИ
РЕПАРАЦІЇ ГЕНІВ

<130> CIBUS-026-PCT

<140> PCT/US2014/029621

<141> 2014-03-14

<150> 61/801,320

<151> 2013-03-15

<160> 6

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 43

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 1
vccctcgtga ccaccttcac ctacggcgtg cagtgccttca gch 43

<210> 2

<211> 43

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 2
vgctgaagca ctgcacgccg taggtgaagg tggtcacgag ggh 43

<210> 3

<211> 43

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 3
vccctcgtga ccaccttcac ccacggcgtg cagtgccttca gch 43

<210> 4

<211> 43

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 4
vgctgaagca ctgcacgccg tgggtgaagg tggtcacgag ggh 43

<210> 5

<211> 78

```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(78)

<400> 5
ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc acc cac ggc gtg cag      48
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr His Gly Val Gln
1          5          10          15

tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag      78
Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
          20          25

<210> 6
<211> 26
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 6
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr His Gly Val Gln
1          5          10          15

Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
          20          25

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб введення мутації, опосередкованої олігонуклеосою для репарації генів (GRON), у цільову послідовність дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) у клітині, який **відрізняється** тим, що включає культивування клітини при умовах, які підсилюють один або більше процесів репарації клітинної ДНК, перед й/або одночасно з доставкою GRON у клітину рослини, так що умови, які підсилюють один або більше процесів репарації клітинної ДНК, включають введення
- 10 однієї або більше сайтспецифічних ендонуклеаз, які індукують одониткові розриви, в клітину рослини.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що одну або більше сайтспецифічних ендонуклеаз, які індукують одониткові розриви, вибирають з TALEN, ендонуклеаз із цинковими пальцями і мегануклеаз.
- 15 3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що одна або більше сайтспецифічних ендонуклеаз, які індукують одониткові розриви, ковалентно зв'язані з GRON.
4. Спосіб за одним із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що клітина являє собою клітину рослини, що належить до виду, вибраного з групи, що складається з наступних видів: канола, соняшник, кукурудза, тютюн, цукровий буряк, бавовник, пшениця, ячмінь, рис, люцерна, сорго, томат,
- 20 манго, персик, яблуко, груша, полуниця, банан, диня, картопля, морква, латук, цибуля, види сої, включаючи сою культурну, цукрова тростина, горох, нут, горох польовий, кінський біб, сочевиця, ріпа, бруква, брюссельська капуста, люпин, цвітна капуста, капуста кормова, кормові боби, тополя, сосна, евкالیпт, виноград, цитрусова рослина, тритикале, люцерна, жито, овес, дерен і кормові трави, льон, олійний рапс, гірчиця, огірок, в'юнок, бальзамін, перець, баклажан,
- 25 чорнобривці, лотос, капуста білоголова, ромен, гвоздика, тюльпан, ірис і лілія.
5. Спосіб за одним із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що зазначена клітина є трансгенною.
6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що цільова послідовність ДНК являє собою ендегенний ген зазначеної клітини.
7. Спосіб за одним із пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що зазначений спосіб додатково включає
- 30 відтворення рослини, що містить мутацію, введену за допомогою GRON, із клітини рослини.
8. Застосування однієї або більше сайтспецифічних ендонуклеаз, які вводять одониткові розриви, для поліпшення мутаційного перетворення олігонуклеосою для репарації генів

(GRON) як донорами, що включають введення однієї або більше сайтспецифічних ендонуклеаз в клітину.

9. Застосування за п. 8, яке **відрізняється** тим, що одну або більше сайтспецифічних ендонуклеаз, які індукують односторонні розриви, вибирають з TALEN, ендонуклеаз із цинковими пальцями і мегануклеаз.

10. Спосіб за п. 1, який додатково включає оцінку ефективності перетворення GRON, причому спосіб включає:

введення GRON у протопласт рослини, експресуючий цільову послідовність ДНК, що кодує синій флуоресцентний білок, при цьому GRON сконфігурований таким чином, щоб він вводив мутацію у заздалегідь визначеному сайті цільової послідовності ДНК, щоб викликати перетворення синього флуоресцентного білка, у результаті якого синій флуоресцентний білок буде випускати флуоресценцію на відмінній довжині хвилі, при цьому перед або одночасно з введенням GRON, ДНК всередині протопласта приводять у контакт із однією або більше ендонуклеаз, які вводять односторонні розриви в цільову послідовність ДНК всередині сайту, на який націлений GRON; і

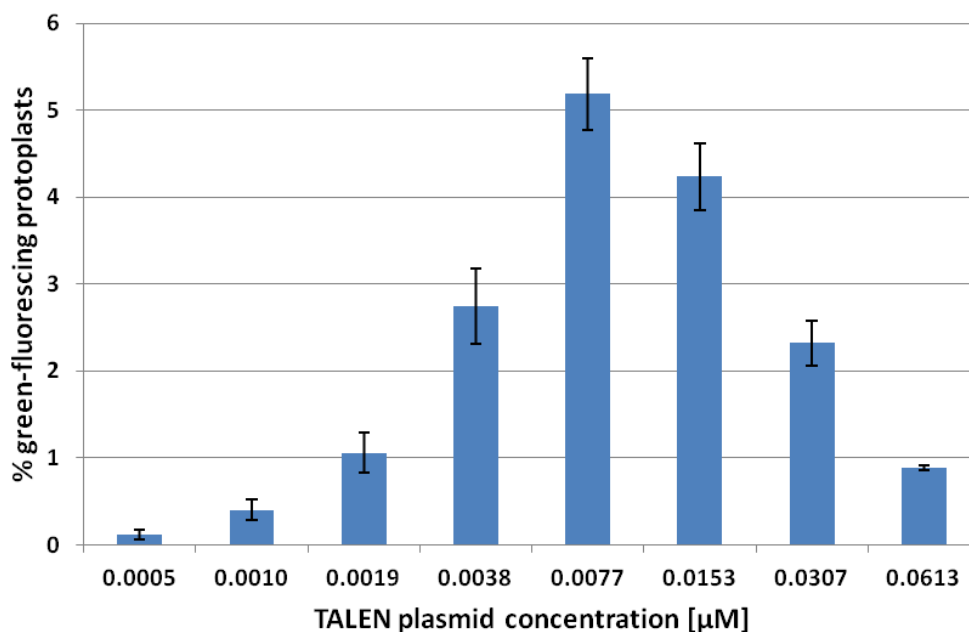
визначення ефективності перетворення.

11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що одну або більше сайтспецифічних ендонуклеаз, які вводять односторонні розриви, вибирають з TALEN, ендонуклеаз із цинковими пальцями і мегануклеаз.

12. Спосіб за п. 10 або 11, який **відрізняється** тим, що цільова послідовність ДНК є присутньою у хромосомній ДНК протопласта.

13. Спосіб за п. 10 або 11, який **відрізняється** тим, що цільова послідовність ДНК є присутньою у плазміді.

14. Спосіб за одним із пп. 10-13, який **відрізняється** тим, що одна або більше сайтспецифічних ендонуклеаз, які вводять односторонні розриви забезпечують підвищену ефективність перетворення у порівнянні з ефективністю, визначеною для GRON під час відсутності зазначеної однієї або декількох сполук, які вводять односторонні розриви.



Фіг. 1

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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