



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 120033

(13) C2

(51) МПК

C12N 15/115 (2010.01)

C12N 15/82 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 08560
(22) Дата подання заявки: 14.03.2014
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.09.2019
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/801,333
(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: 11.04.2016, Бюл.№ 7
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2019, Бюл.№ 18
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2014/029566, 14.03.2014

(72) Винахідник(и):
Бітем Пітер Р. (US),
Гокал Грегори Ф.В. (US),
Шопке Крістіан (US),
Сойер Ноель Джой (US),
Пірс Джеймс (US),
Сегами Роза Е. (US),
Мозорук Джеррі (US)
(73) Власник(и):
СІБАС ЮС ЛЛС,
6455 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA
92121, United States of America (US),
СІБАС ЮРОП Б.В.,
Goessestraatweg 19, NL-Ch4421 AD Kapelle,
The Netherlands (NL)
(74) Представник:
Кістерський Тимофій Арсенійович,
реєстр. №457
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Bonner M et al, "DNA breakage associated with targeted gene alteration directed by DNA oligonucleotides", Mutation Research, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 669, no. 1-2, 02.10.2009, P. 85 – 94
M. Jinek et al, "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity", Science, 17.08.2012, vol. 337, no. 6096, P. 816 – 821
Beetham PR et al, "A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations", Proceedings of the National Academy of Sciences, National Academy of Sciences, US, 01.07.1999, vol. 96, P. 8774 – 8778
Rice M C et al, "Genetic Repair of Mutations in Plant Cell-Free Extracts Directed By specific Chimeric Oligonucleotides", Plant Physiology, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, US, 01.06.2000, vol. 123, no. 2, P. 427–437
WO 2011/117249 A1, 29.09.2011
US 2012/178628 A1, 12.07.2012
US 2012/122223 A1, 17.05.2012
US 2011/124072 A1, 26.05.2011

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

UA 120033 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується способу введення мутації, опосередкованої олігонуклеосомою для репарації генів (GRON), у цільову послідовність дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) у клітині рослини, який включає: доставку GRON у клітину, при цьому GRON має одну або більше і, переважно 2, 3, 4, 5 або більше, з наступних властивостей: довжина GRON становить більше, ніж 55 основ, GRON можливо містить два або більше сайтів мутації для їхнього введення в цільову ДНК; GRON містить один або більше нуклеотидів, позбавлених азотистої основи; GRON містить один або більше нуклеотидів 8'-оксо-dA та/або 8'-оксо-dG; GRON містить перевернену основу на 3'-кінці; GRON містить один або більше 2'-О-метил-нуклеотидів на 5'-або 3'-кінці; GRON містить один або більше 2'-О-метил-ПНК-нуклеотидів на 5'-кінці; GRON містить щонайменше два 2'-О-метил-ПНК-нуклеотиди на 5'-кінці; GRON містить інтеркалюючий барвник; GRON містить 5'-кінцевий кеп; GRON містить модифікацію кістяка, вибрану з групи, що складається з фосфотіоатної модифікації, метилфосфонатної модифікації, модифікації замкненою нуклеїною кислотою (ЗНК), модифікації О-(2-метоксіетилом) (МОЕ), модифікації ди-PS і модифікації пептидо-нуклеїною кислотою (ПНК); GRON містить одну або більше внутрішньоланцюгових поперечних зшивок; GRON містить один або більше флуоресцентних барвників, ковалентно приєднаних до нього; і GRON містить одну або більше основ, які підвищують енергію гібридизації; і доставку комплексу коротких паліндромних повторів, регулярно розташованих групами (CRISPR), у клітину рослини.

[0001] Дана заявка претендує на пріоритет на основі попередньої заявки на патент США № 61/801333, поданої 15 березня 2013 р., зміст якої даним включено в дану заявку за допомогою посилання.

ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ

[0002] Даний винахід у загальному значенні відноситься до нових способів поліпшення ефективності спрямованого модифікування певних положень у геномних або інших послідовностях нуклеотидів. Крім того, даний винахід відноситься до цільової 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

[0003] Наступний опис рівня техніки наведений винятково для полегшення розуміння даного винаходу, і не передбачається, що він описує або становить відомий рівень техніки стосовно даного винаходу.

[0004] Модифікація геномної ДНК має центральне значення для досягнень в області біотехнології загалом, і для досягнень медицини, заснованих на біотехнології, зокрема. Ефективні способи сайт-спрямованих модифікацій генома бажані для дослідження та, можливо, для застосування в генотерапії. В одному підході застосовують утворюючий триплекс олігонуклеотиди (TFO), які сайт-специфічним чином зв'язуються у вигляді третіх ниток з дуплексом ДНК, щоб опосередкувати спрямований мутагенез. Такі TFO можуть здійснювати свою дію або шляхом доставки з'єданого з ними мутагену, такого як псорален або хлорамбуцил (Havre та ін., Proc Nat'l Acad Sci, U.S.A. 90:7879-7883, 1993; Havre та ін., J Virol 67:7323-7331, 1993; Wang та ін., Mol Cell Biol 15:1759-1768, 1995; Takasugi та ін., Proc Nat'l Acad Sci, U.S.A. 88:5602-5606, 1991; Belousov та ін., Nucleic Acids Res 25:3440-3444, 1997), або шляхом зв'язування з достатньою афінністю, щоб викликати репарацію, що допускає помилки (Wang та ін., Science 271:802-805, 1996).

[0005] Інша стратегія геномної модифікації включає індукцію гомологічної рекомбінації між екзогенним фрагментом ДНК і цільовим геном. Даний підхід успішно застосовували для націлювання на вибрані гени та їхні порушення в клітинах ссавців, і він дозволив одержати трансгенних мишей, які несуть нокаут певних генів (Carpenechi та ін., Science 244:1288-1292, 1989; патент США номер 4873191, Wagner). У даному підході, проте, покладаються на перенос селектованих маркерів, щоб дозволити виділення бажаних рекомбінантів. Без селекції у звичайних експериментах з переносу генів відношення гомологічного вбудовування до негомологічного вбудовування трансфікованої ДНК мале, і зазвичай перебуває в діапазоні від 1:1000 або менше (Sedivy та ін., Gene Targeting, W. H. Freeman і Co., Нью-Йорк, 1992). Така низька ефективність гомологічного вбудовування обмежує практичну цінність переносу генів для експериментального застосування або генотерапії. Частоту гомологічної рекомбінації можна збільшити шляхом ушкодження цільового сайту опроміненням УФ і вибраними канцерогенами (Wang та ін., Mol Cell Biol 8:196-202, 1988), а також сайт-специфічними ендонуклеазами (Sedivy та ін., Gene Targeting, W. H. Freeman і Co., Нью-Йорк, 1992; Rouet та ін., Proc Nat'l Acad Sci, U.S.A. 91:6064-6068, 1994; Segal та ін., Proc Nat'l Acad Sci, U.S.A. 92:806-810, 1995). Крім того, ушкодження ДНК, викликане спрямованими на триплекс фотоаддуктами псоралену, може стимулювати рекомбінацію всередині та між позахромосомними векторами (Segal та ін., Proc Nat'l Acad Sci, U.S.A. 92:806-810, 1995; Faruqi та ін., Mol Cell Biol 16:6820-6828, 1996; патент США номер 5962426, Glazer).

[0006] Інше дослідження допомогло визначити параметри, які впливають на рекомбінацію в клітинах ссавців. Зазвичай лінійні донорні фрагменти більш рекомбіногенні, ніж їхні кільцеві аналоги (Folger та ін., Mol Cell Biol 2:1372-1387, 1982). На рекомбінацію також впливає довжина безперервної ділянки гомології між донорним і цільовим сайтами, при цьому короткі фрагменти, очевидно, являють собою неефективні субстрати для рекомбінації (Rubnitz та ін., Mol Cell Biol 4:2253-2258, 1984). Проте, декілька недавніх дослідницьких робіт було сфокусовано на застосуванні коротких фрагментів ДНК або гібридів ДНК/РНК для редагування генів (Kunzelmann та ін., Gene Ther 3:859-867, 1996).

[0007] Властивості сайт-специфічного зв'язування TFO застосовували для доставки ряду різних молекул у цільові сайти в ДНК. Наприклад, у діагностичному способі для вивчення потрібних взаємодій застосовували TFO, з'єднаний з розщеплюючим ДНК агентом Fe-ЕДТА (Moser та ін., Science 238:645-650, 1987). Інші дослідники з'єднували з TFO біологічно активні ферменти, такі як мікрококова нуклеаза та стрептококова нуклеаза, і демонстрували сайт-специфічне розщеплення ДНК (Pei та ін., Proc Nat'l Acad Sci U.S.A. 87:9858-9862, 1990; Landgraf та ін., Biochemistry 33:10607-10615, 1994). Більше того, сайт-спрямованого

ушкодження та мутагенезу ДНК можна домогтися, застосовуючи TFO, кон'югований або з псораленом (Havre та ін., Proc Nat'l Acad Sci U.S.A. 90:7879-7883, 1993; Takasurgi та ін., Proc Nat'l Acad Sci U.S.A. 88:5602-5606, 1991), або з алкілюючими агентами (Belousov та ін., Nucleic Acids Res 25:3440-3444, 1997; Posvic та ін., J Am Chem Soc 112:9428-9430, 1990).

[0008] У патентній заявці WIPO WO/2001/025460 описані способи мутування цільової послідовності ДНК рослини, які включали наступні етапи: (1) електропорацію в мікроспору рослини рекомбінагенної олігонуклеоснови, що містить першу гомологічну ділянку, послідовність якої ідентична послідовності з щонайменше 6 пар основ першого фрагмента цільової послідовності ДНК, і другу гомологічну ділянку, послідовність якої ідентична послідовності щонайменше з 6 пар основ другого фрагмента цільової послідовності ДНК, і проміжна ділянка, що містить щонайменше 1 нуклеоснову, гетерологічну стосовно цільової послідовності ДНК, при цьому дана проміжна ділянка з'єднує першу гомологічну ділянку та другу гомологічну ділянку; (2) культивування мікроспори для одержання зародка; і (3) відтворення з зародка рослини, що містить мутацію, розташовану між першим і другим фрагментами цільової послідовності ДНК, наприклад, шляхом культивування мікроспори для одержання соматичного зародка та відтворення рослини з зародка. У різних варіантах реалізації даного винаходу рекомбіногенна олігонуклеоснова являє собою змішаний дуплексний олігонуклеотид (MDON) і кожна з гомологічних ділянок містить фрагмент РНК, що складається з щонайменше 6 нуклеотидів РНК-типу; довжина проміжної ділянки становить щонайменше 3 нуклеотиди; перший і/або другий фрагмент РНК містить щонайменше 8 безперервних 2'-заміщених рибонуклеотидів.

[0009] Однією з основних цілей біологічного дослідження є спрямована модифікація генома. Вище згадано, що хоча способи доставки генів у клітини ссавців добре розвинені, частота модифікації та/або гомологічної рекомбінації обмежена (Hanson та ін., Mol Cell Biol 15:45-51 1995). У результаті модифікація генів являє собою процес, що вимагає більших витрат часу. Множина способів розглядалася або вживалася, щоб підвищити рівні модифікації та/або рекомбінації між донорною й геномною ДНК. Проте існуючі методики часто призводять до низьких рівнів модифікації та/або рекомбінації, або до невідповідності рівня модифікації та/або рекомбінації, тим самим затрудняючи дослідження та технологію генотерапії.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[0010] Згідно з даним винаходом запропоновані нові способи та композиції для поліпшення ефективності спрямованого модифікування певних положень у геномних або інших послідовностях нуклеотидів. Далі в тексті даної заявки описано, що нуклеїнові кислоти, які направляють певні зміни в геномі, можна комбінувати з різними підходами, щоб підвищити доступність компонентів природних систем репарації, що є присутніми у клітинах, які є мішенню для модифікації.

[0011] У першому аспекті даний винахід відноситься до способів введення опосередкованої GRON (олігонуклеоснова 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; і/або доставку в клітину рослини GRON, довжина якого становить більше, ніж 55 основ, при цьому GRON можливо містить два або більше сайти мутації для їхнього введення в цільову ДНК.

[0012] 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.

[0013] Далі в тексті даної заявки описано, що GRON для застосування в даному винаході можуть містити одну або більше з наступних змін щодо звичайних нуклеотидів РНК і ДНК:

- один або більше нуклеотидів, позбавлених азотистої основи;
- один або більше нуклеотидів 8'-оксо-dA й/або 8'-оксо-dG;
- перевернена основа на його 3'-кінці;
- один або більше 2'-О-метил-нуклеотидів;

один або більше 2'-О-метил-РНК-нуклеотидів на його 5'-кінці, і переважно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше 2'-О-метил-РНК-нуклеотидів;
інтеркалюючий барвник;
5'-кінцевий кеп;

модифікацію каркаса, вибрану з групи, що складається з фосфотіоатної модифікації, метилфосфонатної модифікації, модифікації замкненою нуклеїновою кислотою (ЗНК), модифікації О-(2-метоксіетилом) (МОЕ), модифікації двома фосфотіоатами (ди-PS) і модифікації пептидо-нуклеїновою кислотою (ПНК);

одну або більше внутрішньоланцюгових поперечних зшивок;

один або більше флуоресцентних барвників, кон'югованих з ними, переважно на 5'- або 3'-кінці GRON; і

одну або більше основ, які підвищують енергію гібридизації. Не мають на увазі, що даний перелік накладає обмеження.

[0014] Далі в тексті даної заявки описано, що в деяких варіантах реалізації якості GRON й ефективність перетворення можна поліпшити шляхом синтезу всього або частини GRON із застосуванням нуклеотидних мультимерів, таких як димери, тримери, тетрамери й так далі, що поліпшує його чистоту.

[0015] 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.

[0016] 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 даному тексті.

[0017] 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: 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 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).

[0018] У деяких варіантах реалізації зазначені способи додатково включають відтворення техніки рослини, що містить мутацію, введену за допомогою GRON, із клітини рослини, і може включати збір насіння від рослини.

[0019] 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.

[0020] Інші варіанти реалізації даного винаходу повинні стати очевидні після ознайомлення з наступним докладним описом, типовими варіантами реалізації та формулою винаходу.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

[0021] На фіг. 1 зображене перетворення BFP в GFP, опосередковане GRON, міченими фосфотіоатом (PS) (що містять по 3 молекули PS на кожному кінці GRON), і GRON, міченими 5'-Cy3/3'-idC.

[0022] На фіг. 2 зображені GRON, що містять РНК/ДНК, названі в даній заявці "GRON фрагментів Оказакі".

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[0023] Було показано, що розроблена за останні декілька років методика спрямованої генетичної модифікації, опосередкованої олігонуклеотидами, виявилася корисною для застосування з метою специфічної зміни коротких ділянок ДНК із одержанням делецій, коротких вставок і точкових мутацій. Дані способи включають спарювання/відпал ДНК, а потім події репарації/рекомбінації ДНК. Спочатку нуклеїнова кислота гібридується з комплементарною ниткою у двонитковій ДНК у ході процесу, опосередкованого клітинними

білковими факторами. У результаті такого відпалу утвориться розташована по центру незбіжна пара основ (у випадку точкової мутації), що призводить до порушення структури, яке найбільш ймовірно стимулює ендogenousний білковий апарат, щоб ініціювати другий етап процесу репарації: сайт-специфічну модифікацію хромосомної послідовності, і навіть їх органел (наприклад, мітохондрій і хлоропластів). Така знову введена розбіжність спонукає апарат репарації ДНК здійснити другу подію репарації, що призводить до остаточного виправлення цільового сайту. Способи згідно з даним винаходом поліпшують дані способи, пропонуючи нові підходи, які підвищують доступність компонентів репарації ДНК, таким чином, підвищуючи ефективність та відтворюваність опосередкованих репарацією генів модифікацій цільових нуклеїнових кислот.

Визначення

[0024] Для полегшення розуміння даного винаходу нижче наведені визначення множини термінів.

[0025] Терміни "послідовність нуклеїнової кислоти", "послідовність нуклеотидів" і "полінуклеотидна послідовність" у даній заявці відносяться до олігонуклеотиду або полінуклеотиду, і їхніх фрагментів або частин, і до ДНК або РНК геномного або синтетичного походження, що може бути одно- або двонитковою, і являє собою смислову або антисмислову нитку.

[0026] У даній заявці терміни "олігонуклеотиди" й "олігомери" відносяться до послідовності нуклеїнової кислоти, що складається з щонайменше приблизно 10 нуклеотидів й аж до приблизно 201 нуклеотиду, переважно з приблизно від 15 до 30 нуклеотидів, і більш переважно з приблизно 20-25 нуклеотидів, яка може бути застосована як зонд або амплімер.

[0027] Терміни "модифікуюча ДНК молекула" та "модифікуючий ДНК реагент" у даній заявці відносяться до молекули, що здатна впізнати й специфічно зв'язуватися з послідовністю нуклеїнової кислоти в геномі клітини, і яка здатна модифікувати цільову послідовність нуклеотидів у геномі, при цьому впізнання та специфічне зв'язування модифікуючої ДНК молекули з послідовністю нуклеїнової кислоти не залежить від білків. У даній заявці термін "не залежить від білків" стосовно модифікуючої ДНК молекули означає, що модифікуюча ДНК молекула не потребує присутності й/або активності білка та/або ферменту для впізнання та/або специфічного зв'язування з послідовністю нуклеїнової кислоти. Прикладами модифікуючих ДНК молекул служать, але не обмежені перерахованими, утворюючий триплекс олігонуклеотиди, пептидні нуклеїнові кислоти, поліаміди й олігонуклеотиди, які призначені для стимуляції зміни генів. Модифікуючі ДНК молекули згідно з даним винаходом відрізняються від послідовностей нуклеїнових кислот відомого рівня техніки, які застосовують для гомологічної рекомбінації (Wong і Саресчі, *Molec. Cell. Biol.* 7:2294-2295, 1987), тим, що послідовності нуклеїнових кислот відомого рівня техніки, які застосовують для гомологічної рекомбінації, залежать від білків. У даній заявці термін "залежать від білків" стосовно молекули означає, що для молекули потрібна присутність й/або активність білка та/або ферменту для впізнання та/або специфічного зв'язування зазначеної молекули з послідовністю нуклеїнової кислоти. Способи визначення того, чи потрібна для модифікуючої ДНК молекули присутність й/або активність білка та/або ферменту для впізнання та/або специфічного зв'язування з послідовністю нуклеїнової кислоти, перебувають у рамках компетенції в даній області техніки (див., наприклад, Dennis та ін. *Nucl. Acids Res.* 27:4734-4742, 1999). Наприклад, модифікуючу ДНК молекулу можна інкубувати *in vitro* з послідовністю нуклеїнової кислоти під час відсутності яких-небудь білків і/або ферментів. Виявлення специфічного зв'язування між модифікуючою ДНК молекулою та послідовністю нуклеїнової кислоти демонструє, що модифікуюча ДНК молекула не залежить від білка. З іншого боку, відсутність специфічного зв'язування між модифікуючою ДНК молекулою та послідовністю нуклеїнової кислоти демонструє, що модифікуюча ДНК молекула залежить від білків і/або вимагає присутності додаткових факторів.

[0028] "Утворюючий триплекс олігонуклеотид" (TFO) являє собою послідовність ДНК або РНК, що здатна зв'язуватись з великою борозенкою дуплекса спіралей ДНК або РНК із утворенням потрібної спіралі. Хоча довжина TFO не обмежена яким-небудь конкретним значенням, переважна довжина TFO становить 200 нуклеотидів або менше, більш переважно 100 нуклеотидів або менше, ще більш переважно від 5 до 50 нуклеотидів, ще більш переважно від 10 до 25 нуклеотидів і найбільш переважно від 15 до 25 нуклеотидів. Хоча деякий ступінь специфічності послідовностей між TFO і дуплексом ДНК необхідний для утворення потрібної спіралі, немає конкретного необхідного ступеня специфічності, за умови, що потрібна спіраль здатна утворитись. Аналогічним чином, немає певного необхідного ступеня авідності або афінності між TFO і подвійною спіраллю, за умови, що потрібна спіраль здатна утворитись.

Без наміру обмежити довжину послідовності нуклеотидів, з якою специфічно зв'язується TFO, в одному варіанті реалізації послідовність нуклеотидів, з якою специфічно зв'язується TFO, складається з від 1 до 100, більш переважно від 5 до 50, ще більш переважно від 10 до 25 і найбільш переважно від 15 до 25 нуклеотидів. Крім того, "потрійна спіраль" являє собою двуспіральну нуклеїнову кислоту з олігонуклеотидом, що зв'язаний з цільовою послідовністю всередині двоспіральної нуклеїнової кислоти. "Двоспіральна" нуклеїнова кислота може бути будь-якою двонитковою нуклеїновою кислотою, включаючи двониткову ДНК, двониткову РНК і змішані дуплекси ДНК і РНК. Довжина двониткової нуклеїнової кислоти не обмежена яким-небудь конкретним значенням. Проте, у переважних варіантах реалізації її довжина більше, ніж 500 п.о., більш переважно більше, ніж 1 т.п.н., і найбільш переважно більше, ніж приблизно 5 т.п.н. У багатьох застосуваннях двоспіральна нуклеїнова кислота являє собою клітинну геномну нуклеїнову кислоту. Утворюючий триплекс олігонуклеотид може зв'язатися з цільовою послідовністю паралельно (з тією самою спрямованістю) або антипаралельно (з протилежною спрямованістю).

[0029] "Пептидні нуклеїнові кислоти", "поліаміди" або "PNA" являють собою нуклеїнові кислоти, в яких фосфатний каркас замінений на поліамідну структуру на основі N-аміноетилгліцину. ПНК мають більш високу афінність до комплементарних нуклеїнових кислот, ніж їхні природні аналоги, слідуючи правилу спарювання основ за Уотсон-Кріком. ПНК можуть утворювати високо стабільні триспіральні структури із ДНК із наступною стехіометрією: (ПНК)₂.ДНК. Хоча довжина пептидних нуклеїнових кислот і поліамідів не обмежена яким-небудь конкретним значенням, переважна довжина пептидних нуклеїнових кислот і поліамідів становить 200 нуклеотидів або менше, більш переважно 100 нуклеотидів або менше і найбільш переважно від 5 до 50 нуклеотидів. Без наміру обмежити довжину послідовності нуклеотидів, з якою специфічно зв'язується пептидна нуклеїнова кислота та поліамід, в одному варіанті реалізації довжина послідовності нуклеотидів, з якою специфічно зв'язується пептидна нуклеїнова кислота та поліамід, становить від 1 до 100, більш переважно від 5 до 50, ще більш переважно від 5 до 25 і найбільш переважно від 5 до 20 нуклеотидів.

[0030] Термін "клітина" відноситься до окремої клітини. Термін "клітини" відноситься до популяції клітин. Популяція може бути чистою популяцією, що містить один тип клітин. Аналогічним чином, популяція може містити більше ніж один тип клітин. У даному винаході не накладається обмеження на кількість типів клітин, які може містити популяція клітин.

[0031] Термін "синхронізувати" або "синхронізовані", що вживається стосовно зразка клітин, або "синхронізовані клітини", або "популяція синхронізованих клітин" відноситься до множини клітин, які обробили таким чином, щоб популяція клітин перебувала в однаковій фазі клітинного циклу. Немає необхідності в тому, щоб всі клітини в зразку були синхронізовані. Невеликий відсоток клітин може залишитися не синхронізованим з більшістю клітин у зразку. Переважний діапазон синхронізованих клітин становить від 10 до 100 %. Більш переважний діапазон становить від 30 до 100 %. Також немає необхідності в тому, щоб клітини являли собою чисту популяцію одного типу клітин. Зразок може містити більше ніж один тип клітин. Щодо цього, лише один із представлених типів клітин може бути синхронізований або може перебувати у відмінній фазі клітинного циклу щодо іншого типу клітин у зразку.

[0032] Термін "синхронізована клітина", що вживається стосовно окремої клітини, означає, що на зазначену клітину впливали таким чином, що вона перебуває у фазі клітинного циклу, яка відрізняється від фази клітинного циклу зазначеної клітини перед впливом. Як альтернатива "синхронізована клітина" відноситься до клітини, на яку впливали, щоб змінити (тобто, збільшити або зменшити) тривалість фази клітинного циклу, на якій зазначена клітина перебувала перед впливом, у порівнянні з контрольною клітиною (наприклад, клітиною під час відсутності впливу).

[0033] Термін "клітинний цикл" відноситься до фізіологічного та морфологічного прогресування змін, які перетерплюють клітини, коли вони діляться (тобто проліферують). Загальноприйнято, що клітинний цикл складається з фаз, названих "інтерфаза", "профаза", "метафаза", "анафаза" та "тілофаза". Крім того, частини клітинного циклу можна назвати "М (мітоз)", "S (синтез)", "G0", "G1 (інтервал 1)" і "G2 (інтервал 2)". Більше того, клітинний цикл включає періоди прогресування, перехідні між перерахованими вище фазами.

[0034] Термін "інгібування клітинного циклу" відноситься до припинення прогресування клітинного циклу в клітині або популяції клітин. Інгібування клітинного циклу зазвичай викликається впливом на клітини агента (хімічного, білкового або іншого), що перешкоджає аспектам фізіології клітини, щоб запобігти продовженню клітинного циклу.

[0035] "Проліферація" або "ріст клітин" відноситься до здатності вихідної клітини періодично ділитися на дві дочірні клітини, що призводить до загального збільшення кількості

клітин у популяції. Популяція клітин може перебувати в організмі або у пристрої для культивування.

[0036] Термін "здатний модифікувати ДНК" або "засоби модифікації ДНК" відноситься до процедур, а також до ендогенних або екзогенних агентів або реагентів, які мають здатність викликати або можуть сприяти індукції змін у послідовності нуклеотидів цільового фрагмента ДНК. Такі зміни можна здійснити шляхом делеції, вставки або заміни однієї або більше основ у цільовому фрагменті ДНК. Немає необхідності в тому, щоб зміни послідовності ДНК призводили до функціональних змін якого-небудь гену, кодованого цільовою послідовністю. Більше того, немає необхідності в тому, щоб зміни в ДНК були внесені у будь-якій конкретній частці або відсотку клітин.

[0037] Термін "послідовність нуклеотидів, яка цікавить" відноситься до будь-якої послідовності нуклеотидів, вплив на яку середній фахівець у даній області техніки може вважати бажаним з якої-небудь причини. Такі послідовності нуклеотидів включають, але не обмежені перерахованими: кодуєчі послідовності структурних генів (наприклад, репортерних генів, генів селективних маркерів, онкогенів, генів лікарської стійкості, факторів росту й так далі) і регуляторні не кодуєчі послідовності, які не кодують мРНК або білковий продукт (наприклад, послідовність промотору, послідовність енансера, послідовність поліаденілювання, послідовність термінації, регуляторні РНК, такі як мРНК і так далі).

[0038] "Послідовність амінокислот", "поліпептидна послідовність", "пептидна послідовність" та "пептид" використовують взаємозамінно в даній заявці для опису послідовності амінокислот.

[0039] "Цільова послідовність" у даній заявці відноситься до двоспіральної нуклеїнової кислоти, що містить послідовність довжиною переважно більше, ніж 8 нуклеотидів, але менше, ніж 201 нуклеотид. У деяких варіантах реалізації довжина цільової послідовності становить переважно від 8 до 30 основ. Цільову послідовність, зазвичай, визначають за послідовністю нуклеотидів на одній з ниток двоспіральної нуклеїнової кислоти.

[0040] У даній заявці "багата пуринами послідовність" або "поліпуринова послідовність" стосовно послідовності нуклеотидів на одній з ниток двоспіральної послідовності нуклеїнової кислоти являє собою безперервну послідовність нуклеотидів, у якій більше ніж 50 % нуклеотидів цільової послідовності містять пуринову основу. Проте, переважно, щоб багата пуринами цільова послідовність містила більше, ніж 60 % пуринових нуклеотидів, більш переважно більше, ніж 75 % пуринових нуклеотидів, ще більш переважно більше, ніж 90 % пуринових нуклеотидів, і найбільше переважно 100 % пуринових нуклеотидів.

[0041] У даній заявці "багата піримідинами послідовність" або "поліпіримідинова послідовність" стосовно послідовності нуклеотидів на одній з ниток двоспіральної послідовності нуклеїнової кислоти являє собою безперервну послідовність нуклеотидів, у якій більше ніж 50 % нуклеотидів цільової послідовності містять піримідинову основу. Проте, переважно, щоб багата піримідинами цільова послідовність містила більше, ніж 60 % піримідинових нуклеотидів, і більш переважно більше, ніж 75 % піримідинових нуклеотидів. У деяких варіантах реалізації зазначена послідовність містить переважно більше, ніж 90 % піримідинових нуклеотидів, і в інших варіантах реалізації найбільш переважно містить 100 % піримідинових нуклеотидів.

[0042] "Варіант" першої послідовності нуклеотидів являє собою послідовність нуклеотидів, яка відрізняється від першої послідовності нуклеотидів (наприклад, тим, що містить одну або більше делецій, вставок або замін, які можна виявити, застосовуючи гібридизаційні аналізи або застосовуючи секвенування ДНК). В обсяг даного визначення входить виявлення змін або модифікацій у геномній послідовності першої послідовності нуклеотидів. Наприклад, гібридизаційні аналізи можна застосовувати для виявлення (1) змін у паттерні рестрикційних фрагментів, здатних гібридизуватися з першою послідовністю нуклеотидів, при включенні в геном (тобто, аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ)), (2) нездатності вибраної частини першої послідовності нуклеотидів гібридизуватися із зразком геномної ДНК, що містить першу послідовність нуклеотидів (наприклад, застосовуючи алель-специфічні олігонуклеотидні зонди), (3) неправильної або несподіваної гібридизації, такої як гібридизація з локусом, відмінним від нормального хромосомного локусу для першої послідовності нуклеотидів (наприклад, застосовуючи флуоресцентну гібридизацію in situ (FISH) з препаратами метафазних хромосом і так далі). Один приклад варіанта являє собою мутовану послідовність дикого типу.

[0043] Терміни "нуклеїнова кислота" та "немодифікована нуклеїнова кислота" у даній заявці відносяться до будь-якої з чотирьох відомих основ дезоксирибонуклеїнових кислот (тобто до гуаніну, аденіну, цитозину й тиміну). Термін "модифікована нуклеїнова кислота" відноситься до

нуклеїнової кислоти, структура якої змінена у порівнянні з структурою немодифікованої нуклеїнової кислоти. Наочним прикладом таких модифікацій будуть заміщаючі ковалентні модифікації основ, такі як алкілування атомів азоту в аміногрупі та гетероциклі, а також насичення подвійних зв'язків.

[0044] У даній заявці терміни "мутація" та "модифікація" й їхні граматичні еквіваленти, коли їх застосовують стосовно послідовності нуклеїнової кислоти, використовують взаємозамінно для опису делеції, вставки, заміни, розриву нитки й/або введення аддукту. "Делеція" являє собою заміну в послідовності нуклеїнової кислоти, при якій один або більше нуклеотидів відсутні. "Вставка" або "додавання" являє собою таку заміну в послідовності нуклеїнової кислоти, що призвела до додавання одного або більше нуклеотидів. "Заміна" відбувається в результаті заміщення одного або більше нуклеотидів молекулою, що являє собою відмінну молекулу від заміщеного одного або більше нуклеотидів. Наприклад, нуклеїнову кислоту можна замінити на відмінну нуклеїнову кислоту, прикладом чого служить заміщення тиміну на цитозин, аденін, гуанін або уридин. Заміну піримідину на піримідин (наприклад, нуклеотидні заміни С на Т або Т на С) або пурину на пурин (наприклад, нуклеотидні заміни G на A або A на G) називають транзиціями, тоді як заміну піримідину на пурин або пурину на піримідин (наприклад, G на Т, або G на С, або А на Т, або А на С) називають трансверсіями. Як альтернатива нуклеїнову кислоту можна замінити на модифіковану нуклеїнову кислоту, прикладом чого служить заміщення тиміну на тимінгліколь. Мутації можуть призводити до розбіжності. Термін "розбіжність" відноситься до нековалентної взаємодії між двома нуклеїновими кислотами, при цьому кожна нуклеїнова кислота розташована на окремій полінуклеотидній послідовності, яка не слідує правилу спарювання основ. Наприклад, у частково комплементарних послідовностях 5'-AGT-3' і 5'-AAT-3' є присутньою розбіжність G-A (транзиція). Терміни "введення аддукта" або "утворення аддукта" відносяться до ковалентного або нековалентного з'єднання молекули з одним або більше нуклеотидами у послідовності ДНК таким чином, що з'єднання призводить до зниження рівня реплікації та/або транскрипції ДНК на переважно від 10 % до 100 %, більш переважно від 50 % до 100 % і найбільше переважно від 75 % до 100 %.

[0045] Термін "розрив нитки" коли він вживається стосовно двониткової послідовності нуклеїнової кислоти, включає одноститковий розрив і/або двонитковий розрив. Одноститковий розрив (нік) відноситься до розриву в одній з двох ниток двониткової послідовності нуклеїнової кислоти. Навпаки, двонитковий розрив відноситься до розриву обох ниток двониткової послідовності нуклеїнової кислоти. Розриви ниток можна ввести у двониткову послідовність нуклеїнової кислоти або безпосередньо (наприклад, за допомогою іонізуючого випромінювання або обробки деякими хімічними речовинами), або опосередковано (наприклад, шляхом ферментативного розщеплення в основі нуклеїнової кислоти).

[0046] Терміни "мутантна клітина" та "модифікована клітина" відносяться до клітини, що містить щонайменше одну модифікацію в геномній послідовності зазначеної клітини.

[0047] Термін "частина", коли його застосовують стосовно послідовності нуклеотидів, відноситься до фрагментів даної послідовності нуклеотидів. Розмір фрагментів може перебувати в діапазоні від 5 нуклеотидних залишків до цілої послідовності нуклеотидів без одного залишку нуклеїнової кислоти.

[0048] Говорять, що в молекул ДНК є "5'-кінці" та "3'-кінці", тому що мононуклеотиди вступають у реакцію з утворенням олігонуклеотидів таким чином, що 5'-фосфат одного пентозного кільця мононуклеотиду приєднується до 3'-кисню сусіднього в одному напрямку шляхом утворення фосфодієфірного зв'язку. Отже, кінець олігонуклеотиду називають "5'-кінцем", якщо його 5'-фосфат не з'єднаний з 3'-киснем пентозного кільця мононуклеотиду. Кінець олігонуклеотиду називають "3'-кінцем", якщо його 3'-кисень не з'єднаний з 5'-фосфатом іншого пентозного кільця мононуклеотиду. У даній заявці послідовність нуклеїнової кислоти, навіть якщо вона перебуває всередині більшого олігонуклеотиду, також може мати 5'- і 3'-кінці. Як у лінійній, так і у кільцевій молекулі ДНК окремі елементи називають розташованими "проти ходу транскрипції" або розташованими з 5'-сторони від елементів, розташованих "по ходу транскрипції" або з 3'-сторони. Дана термінологія відображає те, що транскрипція йде в напрямку від 5'-кінця до 3'-кінця уздовж нитки ДНК. Промоторний і енхансерний елементи, які направляють транскрипцію пов'язаного з ними гена, як правило розташовані з 5'-сторони або проти ходу транскрипції від кодуєчої області. Проте, енхансерні елементи можуть здійснювати свою дію навіть коли вони розташовані з 3'-сторони від промоторного елемента та кодуєчої області. Сигнали термінації транскрипції та поліаденілювання розташовані з 3'-сторони або по ходу транскрипції від кодуєчої області.

[0049] Термін "рекомбінантна молекула ДНК" у даній заявці відноситься до молекули ДНК, що складається з фрагментів ДНК, з'єднаних один із одним за допомогою методик молекулярної біології.

5 [0050] Термін "рекомбінантний білок" або "рекомбінантний поліпептид" у даній заявці відноситься до білкової молекули, яку експресують із застосуванням рекомбінантної молекули ДНК.

[0051] У даному тексті терміни "вектор" і "носій" використовують взаємозамінно стосовно молекул нуклеїнових кислот, які переносять фрагмент(и) ДНК від однієї клітини до іншої.

10 [0052] Терміни "у функціональній комбінації", "у функціональному порядку" й "функціонально зв'язаний" у даному тексті відносяться до з'єднання послідовностей нуклеїнових кислот таким чином, що одержують молекулу нуклеїнової кислоти, здатну направляти транскрипцію даного гена та/або синтез переважної білкової молекули. Зазначені терміни також відносяться до з'єднання послідовностей амінокислот таким чином, що одержують функціональний білок.

15 [0053] Термін "трансфекція" у даній заявці відноситься до впровадження чужорідної ДНК у клітини. Трансфекцію можна здійснити за допомогою різних способів, відомих у даній області техніки, включаючи копреципітацію ДНК із фосфатом кальцію, опосередковану ДЕАЕ-декстраном трансфекцію, опосередковану полібренном трансфекцію, електропорацію, мікроін'єкцію, злиття ліпосом, трансфекцію ліпофектином, злиття протопластів, ретровірусну інфекцію, біолістику (тобто бомбардування частинками) і тому подібні способи.

20 [0054] У даному тексті терміни "комплементарний" або "комплементарність" застосовують стосовно "полінуклеотидів" й "олігонуклеотидів" (які являють собою взаємозамінні терміни, які відносяться до послідовності нуклеотидів), зв'язані за правилами спарювання основ. Наприклад, послідовність "5'-CAGT-3'" комплементарна послідовності "5'-ACTG-3'". Комплементарність може бути "частковою" або "тотальною". "Часткова" комплементарність дотримується, коли одна або більше основ нуклеїнових кислот не підходить для утворення пари за правилами спарювання основ. "Тотальна" або "повна" комплементарність між нуклеїновими кислотами дотримується, коли всі без винятку основи нуклеїнових кислот підходять для утворення пари з іншими основами за правилами спарювання основ. Ступінь комплементарності між нитками нуклеїнових кислот може чинити суттєвий вплив на ефективність й силу гібридизації між нитками нуклеїнових кислот. Це може мати особливе значення в реакціях ампліфікації, а також у способах детектування, які залежать від зв'язування між нуклеїновими кислотами. Для зручності терміни "полінуклеотиди" й "олігонуклеотиди" включають молекули, які містять нуклеозиди.

35 [0055] У даному тексті терміни "гомологія" та "гомологічний" стосовно послідовностей нуклеотидів відносяться до ступеня комплементарності з іншими послідовностями нуклеотидів. Може спостерігатися часткова гомологія або повна гомологія (тобто ідентичність). Стосовно до двониткової послідовності нуклеїнової кислоти, такої як кДНК або геномний клон, термін "по суті гомологічний" відноситься до будь-якої послідовності нуклеїнової кислоти (наприклад, зонду), яка може гібридизуватися з будь-якою або обома нитками двониткової послідовності нуклеїнової кислоти при умовах низької суворості, описаних вище. Послідовність нуклеотидів, що частково комплементарна, тобто "по суті гомологічна" послідовності нуклеїнової кислоти, являє собою таку послідовність, яка щонайменше частково інгібує гібридизацію повністю комплементарної послідовності з цільовою послідовністю нуклеїнової кислоти. Інгібування гібридизації повністю комплементарної послідовності з цільовою послідовністю можна досліджувати, застосовуючи гібридизаційний аналіз (саузерн-блоттинг або нозерн-блоттинг, гібридизацію в розчині та тому подібні аналізи) при умовах низької суворості. По суті гомологічна послідовність або зонд будуть конкурувати й інгібувати зв'язування (тобто гібридизацію) повністю гомологічної послідовності з цільовою послідовністю при умовах низької суворості. Це зовсім не означає, що умови низької суворості допускають неспецифічне зв'язування; умови низької суворості вимагають, щоб зв'язування двох послідовностей одна з одною являло собою специфічну (тобто, виборчу) взаємодію. Відсутність неспецифічного зв'язування можна досліджувати, застосовуючи другу цільову послідовність, в якій відсутня навіть часткова комплементарність (наприклад, ідентичність менше ніж приблизно на 30 %); під час відсутності неспецифічного зв'язування зонд не буде гібридизуватися з другою некомплементарною мішенню.

50 [0056] Умови низької суворості включають умови, еквівалентні зв'язуванню або гібридизації при 68 °C у розчині, що складається з 5 × SSPE (43,8 г/л NaCl, 6,9 г/л Na₂PO₄·H₂O та 1,85 г/л EDTA, рН підведений до 7,4 за допомогою NaOH), 0,1 % ДСН, 5 × реагенту Денхардта (50 × реагент Денхардта містить на 500 мл: 5 г фіколу (типу 400, Pharmacia), 5 г БСА (фракція V;

Sigma)) і 100 мкг/мл денатурованої ДНК із молоко лососевих, після чого слідує промивання в розчині, що містить 2,0×SSPE, 0,1 % ДСН при кімнатній температурі, коли використовують зонд довжиною від приблизно 100 до приблизно 1000 нуклеотидів.

[0057] Крім того, у даній області техніки добре відомі умови, які викликають гібридизацію при умовах високої суворості (наприклад, підвищення температури етапів гібридизації та/або промивання, застосування формаміду в розчині для гібридизації й так далі). Умови високої суворості, коли їх застосовують стосовно гібридизації нуклеїнових кислот, включають умови, еквівалентні зв'язуванню або гібридизації при 68 °С у розчині, що складається з 5 × SSPE, 1 % ДСН, 5 × реагенту Денхардта та 100 мкг/мл денатурованої ДНК із молоко лососевих, після чого слідує промивання в розчині, що містить 0,1 × SSPE й 0,1 % ДСН при 68 °С, коли використовують зонд довжиною від приблизно 100 до приблизно 1000 нуклеотидів.

[0058] У даній області техніки добре відомо, що можна використовувати множину еквівалентних умов, щоб одержати умови низької суворості; фактори, такі як довжина та природа зонда (ДНК, РНК, склад основ) і природа мішені (ДНК, РНК, склад основ, знаходження в розчині або іммобілізація й так далі) і концентрація солей та інших компонентів (наприклад, присутність або відсутність формаміду, сульфату декстрану, поліетиленгліколю), а також компоненти розчину для гібридизації, можна змінювати, щоб одержати умови низької суворості гібридизації, відмінні від перерахованих вище умов, але еквівалентні ним.

[0059] Термін "еквівалент", вживається для опису того, як умова гібридизації відноситься до цікавлячої умови гібридизації, означає, що умова гібридизації та цікавляча умова гібридизації призводять до гібридизації послідовностей нуклеїнових кислот, у яких спостерігається однаковий діапазон відсотків (%) гомології. Наприклад, якщо цікавляча умова гібридизації призводить до гібридизації першої послідовності нуклеїнової кислоти з іншими послідовностями нуклеїнових кислот, які гомологічні на 50 %-70 % першій послідовності нуклеїнової кислоти, то іншу умову гібридизації називають еквівалентною цікавлячій умові гібридизації, якщо дана інша умова гібридизації також призводить до гібридизації першої послідовності нуклеїнової кислоти з іншими послідовностями нуклеїнових кислот, які гомологічні на 50 %-70 % першій послідовності нуклеїнової кислоти.

[0060] У даному тексті термін "гібридизація" використовують для позначення спарювання комплементарних нуклеїнових кислот із застосуванням будь-якого процесу, за допомогою якого нитка нуклеїнової кислоти з'єднується з комплементарною ниткою шляхом спарювання основ з утворенням гібридизаційного комплексу. На гібридизацію та силу гібридизації (тобто силу асоціації між нуклеїновими кислотами) впливають такі фактори, як ступінь комплементарності між нуклеїновими кислотами, використовувана суворість умов, T_m утвореного гібриду та відношення G:C у нуклеїнових кислотах.

[0061] У даній заявці термін "гібридизаційний комплекс" відноситься до комплексу, що утворюється між двома послідовностями нуклеїнових кислот завдяки утворенню водневих зв'язків між комплементарними основами G і C і між комплементарними основами A і T; дані водневі зв'язки можна додатково стабілізувати міжплощинними взаємодіями основ. Дві комплементарні послідовності нуклеїнових кислот зв'язуються водневими зв'язками в антипаралельній конфігурації. Гібридизаційний комплекс може утворитися в розчині (наприклад, аналіз C_{ot} або R_{ot}) або між однією послідовністю нуклеїнової кислоти, присутньою у розчині, і іншою послідовністю нуклеїнової кислоти, іммобілізованою на твердій підкладці (наприклад, на нейлоновій мембрані або нітроцелюлозному фільтрі, використовуваних при саузерн-блоттингу й нозерн-блоттингу, дот-блоттингу, або на предметному склі, використовуваному при гібридизації *in situ*, включаючи FISH (флуоресцентну гібридизацію *in situ*)).

[0062] У даному тексті термін " T_m " використовують для позначення "температури плавлення". Температура плавлення являє собою температуру, при якій половина популяції дwonиткових молекул нуклеїнових кислот дисоціює на окремі нитки. Рівняння для обчислення T_m нуклеїнових кислот добре відомо в даній області техніки. Як зазначено в стандартних опорних джерелах, спрощену оцінку значення T_m можна одержати за допомогою рівняння: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G+C)$, коли нуклеїнова кислота перебуває у водному розчині при 1 M NaCl (див., наприклад, Anderson й Young, Quantitative Filter Hybridization, в Nucleic Acid Hybridization, 1985). В інших джерелах знаходяться більше витончені обчислення, у яких для розрахунку T_m враховуються структурні властивості, а також особливості послідовності.

[0063] У даному тексті термін "суворість" використовують стосовно умов температури, іонної сили та присутності інших сполук, таких як органічні розчинники, при яких здійснюють гібридизацію нуклеїнових кислот. "Суворість" зазвичай спостерігається в діапазоні від приблизно T_m °С до температури, приблизно на 20 °С-25 °С нижче T_m . Для фахівців у даній

області техніки буде очевидно, що сувору гібридизацію можна використовувати, щоб визначити або виявити ідентичні полінуклеотидні послідовності або щоб визначити або виявити схожі або родинні полінуклеотидні послідовності.

[0064] Терміни "специфічне зв'язування", "специфічність зв'язування" й їхні граматичні еквіваленти, коли їх застосовують для опису зв'язування першої послідовності нуклеотидів із другою послідовністю нуклеотидів, відносяться до кращої взаємодії між першою послідовністю нуклеотидів і другою послідовністю нуклеотидів у порівнянні з взаємодією між другою послідовністю нуклеотидів і третьою послідовністю нуклеотидів. Специфічне зв'язування являє собою відносний термін, що не вимагає абсолютної специфічності зв'язування; інакше кажучи, термін "специфічне зв'язування" не вимагає того, щоб друга послідовність нуклеотидів взаємодіяла з першою послідовністю нуклеотидів при відсутності взаємодії між другою послідовністю нуклеотидів і третьою послідовністю нуклеотидів. Скоріше, досить, щоб рівень взаємодії між першою послідовністю нуклеотидів і другою послідовністю нуклеотидів був більше, ніж рівень взаємодії між другою послідовністю нуклеотидів і третьою послідовністю нуклеотидів. "Специфічне зв'язування" першої послідовності нуклеотидів із другою послідовністю нуклеотидів також означає, що взаємодія між зазначеною першою послідовністю нуклеотидів і зазначеною другою послідовністю нуклеотидів залежить від наявності конкретної структури на або всередині першої послідовності нуклеотидів; інакше кажучи, друга послідовність нуклеотидів скоріше взаємодіє та зв'язується з певною структурою на або всередині першої послідовності нуклеотидів, ніж з нуклеїновими кислотами або з послідовностями нуклеотидів взагалі. Наприклад, якщо друга послідовність нуклеотидів специфічна до структури "А", що перебуває на або всередині першої послідовності нуклеотидів, присутність третьої послідовності нуклеїнової кислоти, що містить структуру А, зменшить кількість других послідовностей нуклеотидів, які зв'яжуться з першими послідовностями нуклеотидів.

[0065] У тексті даної заявки термін "ампліфікована нуклеїнова кислота" використовують стосовно нуклеїнових кислот, які можна ампліфікувати за допомогою будь-якого способу ампліфікації. Передбачається, що термін "ампліфікована нуклеїнова кислота" зазвичай буде включати "еталонну матрицю".

[0066] Терміни "гетерологічна послідовність нуклеїнової кислоти" або "гетерологічна ДНК" використовують взаємозамінно для опису послідовності нуклеотидів, що лігують з послідовністю нуклеїнової кислоти, з якою вона не лігвана у природі, або з якою вона лігвана у відмінному положенні у природі. Гетерологічна ДНК не є ендегенною для клітини, в яку її впроваджують, але її одержують з іншої клітини. Як правило, хоча й не обов'язково, така гетерологічна ДНК кодує РНК і білки, які зазвичай не продукуються клітиною, в якій її експресували. Приклади гетерологічної ДНК включають репортерні гени, регуляторні послідовності транскрипції та трансляції, білки селектованих маркерів (наприклад, білки, які надають лікарську стійкість) і так далі.

[0067] "Ампліфікація" являє собою одержання додаткових копій послідовності нуклеїнової кислоти, і її, як правило, здійснюють, застосовуючи методики полімеразної ланцюгової реакції, добре відомої в даній області техніки (Dieffenbach C W і G S Dveksler (1995) PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Плейнвуд, Нью-Йорк). У даному тексті термін "полімеразна ланцюгова реакція" ("ПЛР") відноситься до способу, описаному К. В. Mullis у патентах США під номерами 4683195 і 4683202, які даним включені в дану заявку за допомогою посилання, в яких описаний спосіб підвищення концентрації фрагмента цільової послідовності в суміші геномної ДНК без проведення клонування або очищення. Довжину ампліфікованого фрагмента переважної цільової послідовності визначають за відносними положеннями двох олігонуклеотидних праймерів по відношенню один до одного й, отже, така довжина є контрольованим параметром. Завдяки тому, що даний процес складається з повторюваних етапів, такий спосіб називають "полімеразною ланцюговою реакцією" (далі позначають "ПЛР"). Тому що бажані ампліфіковані фрагменти цільової послідовності стають переважними послідовностями в суміші (відносно концентрації), їх називають "ампліфікованими за допомогою ПЛР".

[0068] За допомогою ПЛР можливо ампліфікувати одну копію певної цільової послідовності в геномній ДНК до рівня, детектованого декількома різними методиками (наприклад, шляхом гібридизації з міченим зондом; включення біотинільованих праймерів, після чого здійснюють детектування кон'югату авідин-фермент; включення в ампліфікований фрагмент 32Р-мічених дезоксинуклеотидтрифосфатів, таких як dCTP або dATP). Крім геномної ДНК будь-яку олігонуклеотидну послідовність можна ампліфікувати за допомогою підходящого набору

молекул праймерів. Зокрема, ампліфіковані фрагменти, створені в процесі ПЛР, самі по собі є ефективними матрицями для наступних ампліфікацій за допомогою ПЛР.

[0069] Один такий переважний спосіб, особливо для комерційних застосувань, заснований на широко застосовуваній методиці ПЛР у реальному часі TaqMan®, і в ньому алель-специфічна ПЛР скомбінована з блокуючим реагентом (АСБ-ПЛР) для придушення ампліфікації алеля дикого типу. АСБ-ПЛР можна застосовувати для виявлення генеративних або соматичних мутацій у ДНК або РНК, екстрагованих з будь-якого типу тканини, включаючи фіксовані у формаліні заключені у парафін зразки пухлини. Вироблено набір правил для розробки реагенту, що дозволяє чутливе та виборче виявлення окремих точкових замін, вставок або делецій у порівнянні з вихідним алелем дикого типу при тисячократному або більшому надлишку (Morlan J, Baker J, Sinicropi D Mutation Detection by Real-Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method. PLoS ONE 4(2): e4584, 2009).

[0070] Терміни "полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією" та "ЗТ-ПЛР" відносяться до способу зворотної транскрипції послідовності РНК із одержанням суміші послідовностей кДНК, після чого збільшують концентрацію переважного фрагмента транскрибованих послідовностей кДНК у суміші без клонування або очищення. Звичайно, РНК піддають зворотній транскрипції із застосуванням єдиного праймера (наприклад, праймера оліго-dT) перед ампліфікацією за допомогою ПЛР переважного фрагмента транскрибованої ДНК із застосуванням двох праймерів.

[0071] У даному тексті термін "праймер" відноситься до олігонуклеотиду, або зустрічається у природі, як в очищеному переварі рестриктазами, або отриманому синтетичним шляхом, що здатний діяти як точка ініціації синтезу, коли його поміщають в умови, при яких викликається синтез продукту елонгації праймера, який комплементарний нитці нуклеїнової кислоти (тобто у присутності нуклеотидів й індукуючого агента, такого як ДНК-полімераза, і при підходящій температурі та рН). Для максимальної ефективності праймера при ампліфікації він переважно одонитковий, але, як альтернатива він може бути двонитковим. Якщо праймер двонитковий, даний праймер спочатку обробляють для поділу його ниток перед застосуванням для одержання продуктів елонгації. Переважно, праймер являє собою олігодезоксирибонуклеотид. Праймер повинен бути досить довгим, щоб запускати синтез продуктів елонгації у присутності індукуючого агента. Точні довжини праймерів будуть залежати від багатьох факторів, включаючи температуру, джерело праймера та застосовуваний спосіб.

[0072] У даному тексті термін "зонд" відноситься до олігонуклеотиду (тобто, послідовності нуклеотидів), або зустрічається у природі, як в очищеному переварі рестриктазами, або отриманому синтетичним шляхом, рекомбінантним шляхом або шляхом ампліфікації за допомогою ПЛР, що здатний гібридизуватись з іншим цікавлячим олігонуклеотидом. Зонд може бути одонитковим або двонитковим. Зонди корисні для виявлення, ідентифікації та виділення певних послідовностей генів. Передбачається, що будь-який зонд, застосовуваний у даному винаході, буде позначений будь-якою "репортерною молекулою", щоб його можна було детектувати за допомогою будь-якої системи виявлення, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: ферментативну (наприклад, ELISA, а також гістохімічні аналізи на основі ферментів), флуоресцентні, радіоактивну та люмінесцентну системи. Не передбачається, що даний винахід обмежений якою-небудь конкретною системою виявлення або міткою.

[0073] У даному тексті терміни "ендонуклеази рестрикції" та "ферменти рестрикції" відносяться до бактеріальних ферментів, кожний з яких розрізає або надрізає дво- або одноланцюгову ДНК у певному сайті послідовності нуклеотидів або поруч із ним, наприклад, можна застосовувати ендонуклеазний домен ендонуклеази рестрикції типу IIS (наприклад, FokI), як описано в Kim та ін., 1996, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 6:1 156-60.

[0074] У даному тексті термін "олігонуклеотид, що має послідовність нуклеотидів, яка кодує ген", означає послідовність нуклеїнової кислоти, що містить кодуючу область гена, тобто послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує продукт гена. Кодуюча область може бути присутня у кожній з наступних форм: кДНК, геномна ДНК або РНК. Якщо вона присутня у формі ДНК, то олігонуклеотид може бути одонитковим (тобто смислова нитка) або двонитковим. Додатково "олігонуклеотид, що має послідовність нуклеотидів, кодуючих ген", може містити підходящі регуляторні елементи, такі як енхансери, промотори, границі сплайсингу, сигнали поліаденілювання й так далі, при необхідності, щоб дозволити правильну ініціацію транскрипції та/або правильний процесинг первинного транскрипту РНК. Більше того, кодуюча область згідно з даним винаходом може містити ендегенні енхансери, границі сплайсингу, впроваджені послідовності, сигнали поліаденілювання й так далі.

[0075] Сигнали, що контролюють транскрипцію в еукаріот, включають "енхансерні" елементи. Енхансери складаються з коротких груп послідовностей ДНК, які специфічно взаємодіють з клітинними білками, залученими в транскрипцію (Maniatis, T. та ін., Science 236:1237, 1987). Енхансерні елементи були виділені з різних еукаріотичних джерел, включаючи гени з клітин рослин, дріжджів, комах, ссавців і вірусів. Вибір конкретного енхансеру залежить від того, який тип клітин будуть застосовувати для експресії білка, що цікавить.

[0076] Присутність "сигналів сплайсингу" у векторі експресії часто призводить до більш високих рівнів експресії рекомбінантного транскрипту. Сигнали сплайсингу опосередковують видалення інтронів з первинного транскрипту РНК і складаються з донорного й акцепторного сайтів сплайсингу (Sambrook, J. та ін., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ге вид., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Нью-Йорк, стор. 16.7-16.8, 1989). Широко застосовуваний донорний і акцепторний сайт сплайсингу являє собою границю сплайсингу з РНК 16S SV40.

[0077] Для ефективної експресії рекомбінантних послідовностей ДНК в еукаріотичних клітинах потрібна експресія сигналів, що направляють ефективну термінацію та поліаденілювання отриманого транскрипта. Сигнали термінації транскрипції, як правило, розташовані по ходу транскрипції від сигналу поліаденілювання та їхня довжина становить декілька сотень нуклеотидів. Термін "полі(А)-сайт" або "полі(А)-послідовність" у даній заявці означає послідовність ДНК, що направляє як термінацію, так і поліаденілювання утвореного транскрипта РНК. Ефективне поліаденілювання рекомбінантного транскрипта бажане, тому що транскрипти, в яких немає полі(А)-хвоста, нестабільні та швидко деградують. Полі(А)-сигнал, застосовуваний у векторі експресії, може бути "гетерологічним" або "ендогенним". Ендогенний полі(А)-сигнал являє собою полі(А)-сигнал, що зазвичай розташований на 3'-кінці кодуєчої області даного гена в геномі. Гетерологічний полі(А)-сигнал являє собою полі(А)-сигнал, що виділяють з одного гена та поміщають з 3'-сторони від іншого гена.

[0078] У даному тексті термін "промотор", "промоторний елемент" або "послідовність промотору" відноситься до послідовності ДНК, яка, коли її поміщають на 5'-кінці від олігонуклеотидної послідовності (тобто вона передуватиме їй), здатна контролювати транскрипцію зазначеної олігонуклеотидної послідовності з утворенням мРНК. Промотор зазвичай розташований з 5'-сторони (тобто проти ходу транскрипції) від олігонуклеотидної послідовності, транскрипцію якої з утворенням мРНК він контролює, і надає сайт для специфічного зв'язування РНК-полімерази та для ініціації транскрипції.

[0079] Термін "активність промотору", коли його вживають стосовно послідовності нуклеїнової кислоти, відноситься до здатності послідовності нуклеїнової кислоти ініціювати транскрипцію олігонуклеотидної послідовності з утворенням мРНК.

[0080] Термін "тканиноспецифічний", коли його вживають стосовно промотору, відноситься до промотору, що здатний направляти селективну експресію олігонуклеотидної послідовності у певному типі тканини при відносній відсутності експресії того самого олігонуклеотиду у відмінному типі тканини. Тканиноспецифічність промотору можна оцінити, наприклад, шляхом функціонального зв'язування репортерного гена з послідовністю промотору з одержанням репортерної конструкції, введення зазначеної репортерної конструкції в геном рослини або тварини таким чином, що репортерна конструкція вбудовується в кожен тип тканини отриманої в результаті цього трансгенної тварини, і виявлення експресії репортерного гена (наприклад, виявлення мРНК, білка або активності білка, кодованого репортерним геном) у різних тканинах трансгенної рослини або тварини. Селективність не обов'язково повинна бути абсолютною. Виявлення більшого рівня експресії репортерного гена в одній або більше тканинах у порівнянні з рівнем експресії репортерного гена в інших тканинах показує, що даний промотор специфічний для тканин, у яких виявлені більші рівні експресії.

[0081] Термін "специфічний для типу клітин" стосовно до промотору відноситься до промотору, що здатний направляти виборчу експресію олігонуклеотидної послідовності у певному типі клітин при відносній відсутності експресії цієї самої олігонуклеотидної послідовності у відмінному типі клітин у тій самій тканині. Термін "специфічний для типу клітин" стосовно до промотору також означає промотор, здатний викликати виборчу експресію олігонуклеотиду на деякій області всередині однієї тканини. Знову ж, селективність не обов'язково повинна бути абсолютною. Специфічність промотору для типу клітин можна оцінити, застосовуючи способи, добре відомі в даній області техніки, наприклад, імуногістохімічне фарбування, описане в даній заявці. Коротко, зрізи тканини поміщають у парафін, і заключені у парафін зрізи приводять у взаємодію з первинним антитілом, яке специфічне до поліпептидного продукту, кодованого олігонуклеотидною послідовністю, експресія якої контролюється зазначеним промотором. Як альтернатива виготовленню

парафінових зрізів можна одержати криозрізи зразків. Наприклад, зрізи можна заморожувати до й у процесі виготовлення зрізів, що дозволяє уникнути потенційного впливу залишкового парафіну. Міченому (наприклад, кон'югованому з пероксидазою) вторинному антитілу, яке специфічне до первинного антитіла, дозволяють зв'язатися із зрізами тканини, і виявляють специфічне зв'язування (наприклад, за допомогою системи авідин/ біотин) шляхом мікроскопії.

[0082] Терміни "виборча експресія", "вибірково експресувати" й їхні граматичні еквіваленти відносяться до порівняння відносних рівнів експресії на двох або більше цікавлячих ділянках. Наприклад, термін "виборча експресія", коли його застосовують стосовно тканини, відноситься до по суті більшого рівня експресії цікавлячого гена у конкретній тканині або до по суті більшої кількості клітин, які експресують даний ген у даній тканині, у порівнянні, відповідно, з рівнем експресії того самого гена та кількістю клітин, експресуючих той самий ген, в іншій тканині (тобто селективність не обов'язково повинна бути абсолютною). Виборча експресія не вимагає, хоча й може включати експресію цікавлячого гена у конкретній тканині та повна відсутність експресії того самого гена в іншій тканині. Аналогічно, "виборча експресія" у даній заявці стосовно типів клітин відноситься до значно більшого рівня експресії або до значно більшої кількості клітин, які експресують цікавлячий ген у конкретному типі клітин, у порівнянні, відповідно, з рівнями експресії гена та з кількістю клітин, експресуючих даний ген, в іншому типі клітин.

[0083] Термін "безперервний", коли його застосовують стосовно двох або більше послідовностей нуклеотидів, означає, що послідовності нуклеотидів лігвані послідовно або під час відсутності послідовностей, що перебувають між ними, або у присутності послідовностей, що перебувають між ними, які не містять одного або більше регуляторних елементів.

[0084] У даному тексті терміни "молекула нуклеїнової кислоти, кодує", "нуклеотид, кодує", "послідовність ДНК, кодує" та "ДНК, кодує", відносяться до порядку або послідовності дезоксирибонуклеотидів у нитці дезоксирибонуклеїнової кислоти. Порядок даних дезоксирибонуклеотидів визначає порядок амінокислот у поліпептидному (білковому) ланцюгу. Послідовність ДНК, таким чином, кодує послідовність амінокислот.

[0085] Термін "ізолюваний", коли його застосовують стосовно нуклеїнової кислоти, як у формулюванні "ізолюваний олігонуклеотид", відноситься до послідовності нуклеїнової кислоти, яку відокремили від щонайменше однієї контамінуючої нуклеїнової кислоти, з якою вона зазвичай зв'язана у природному джерелі. Ізолювана нуклеїнова кислота являє собою нуклеїнову кислоту, що є присутньою у формі або оточенні, які відмінні від форми або оточення, в яких вона зустрічається у природі. Навпаки, неізолювані нуклеїнові кислоти являють собою нуклеїнові кислоти, такі як ДНК і РНК, які виявлені в такому стані, в якому вони існують у природі. Наприклад, дана послідовність ДНК (наприклад, ген) виявлена на хромосомі клітини-хазяїна у безпосередній близькості від сусідніх генів; послідовності РНК, такі як певна послідовність мРНК кодує певний білок, виявлені в клітині у вигляді сумішей з множиною інших мРНК, які кодують множини білків. Проте, ізолювана нуклеїнова кислота, кодує поліпептид, що цікавить, включає, як приклад, таку нуклеїнову кислоту в клітинах, зазвичай експресуючих цікавлячий поліпептид, у яких нуклеїнова кислота перебуває в хромосомному або позахромосомному положенні, відмінному від такого у природних клітинах, або іншим способом фланкована відмінною послідовністю нуклеїнової кислоти, ніж зустрічається у природі. Ізолювана нуклеїнова кислота або олігонуклеотид може перебувати в одонитковій або двонитковій формі. Ізолювану нуклеїнову кислоту можна легко виявити (при необхідності) за допомогою різних методик (наприклад, гібридизації, дот-блоттингу і так далі). Якщо для експресії білка потрібно застосовувати ізолювану нуклеїнову кислоту або олігонуклеотид, зазначений олігонуклеотид буде містити щонайменше смислову або кодує нитку (тобто олігонуклеотид може бути одонитковим). Як альтернатива він може містити як смислову, так й антисмислову нитку (тобто, олігонуклеотид може бути двонитковим).

[0086] У даному тексті термін "очищений" або "очищати" відноситься до видалення одного або більше (небажаних) компонентів із зразка. Наприклад, якщо рекомбінантні поліпептиди експресуються у бактеріальних клітинах-хазяїнах, поліпептиди очищують шляхом видалення білків клітини-хазяїна, тим самим підвищуючи відсоток рекомбінантних поліпептидів у зразку.

[0087] У даному тексті термін "по суті очищений" відноситься до молекул, або до послідовностей нуклеїнових кислот, або до послідовностей амінокислот, які вилучені з природного оточення, виділені або відділені, і щонайменше на 60 % вільні, переважно на 75 % вільні та більш переважно на 90 % вільні від інших компонентів, з якими вони асоційовані у природі. "Ізолюваний поліонуклеотид", отже, являє собою по суті очищений поліонуклеотид.

[0088] У даному тексті термін "кодуюча область", коли його застосовують стосовно структурного гена, відноситься до послідовностей нуклеотидів, які кодують амінокислоти, що виявляють в утвореному поліпептиді у результаті трансляції молекули мРНК. Кодуюча область в еукаріот, як правило, обмежена з 5'-сторони нуклеотидним триплетом "ATG" який кодує початковий метіонін, і з 3'-сторони одним із трьох триплетів, які являють собою стоп-кодони (тобто TAA, TAG, TGA).

[0089] "Кодуюча послідовність" означає послідовність нуклеїнової кислоти, або комплементарну її послідовність, або її частину, яку можна транскрибувати й/або транслювати для одержання мРНК і/або поліпептиду, або їхніх фрагментів. Кодуючі послідовності включають екзони в геномній ДНК або недоспілі первинні транскрипти РНК, які з'єднуються біохімічним апаратом клітини з утворенням зрілої мРНК. Антисмислова нитка являє собою послідовність, комплементарну такій нуклеїновій кислоті, і за нею можна встановити кодуючу послідовність.

[0090] "Некодуюча послідовність" означає послідовність нуклеїнової кислоти, або комплементарну її послідовність, або її частину, що не транскрибується у послідовність амінокислот *in vivo*, або з якою не взаємодіють тРНК, щоб помістити або спробувати помістити амінокислоту. Некодуючі послідовності включають як інтронні послідовності в геномній ДНК, так і незрілі первинні транскрипти РНК й асоційовані з генами послідовності, такі як промотори, енхансери, сайленсери й так далі.

[0091] У даному тексті термін "структурний ген" або "структурна послідовність нуклеотидів" відноситься до послідовності ДНК, яка кодує РНК або білок, які не контролюють експресію інших генів. Навпаки, "регуляторний ген" або "регуляторна послідовність" являє собою ген, що кодує продукти (наприклад, транскрипційні фактори), що контролюють експресію інших генів.

[0092] У даному тексті термін "регуляторний елемент" відноситься до генетичного елемента, що контролює деякий аспект експресії послідовностей нуклеїнових кислот. Наприклад, промотор являє собою регуляторний елемент, що сприяє ініціації транскрипції функціонально пов'язаної з ним кодуючої області. Інші регуляторні елементи включають сигнали сплайсингу, сигнали поліаденілювання, сигнали термінації й так далі.

[0093] У даному тексті термін "сайт зв'язування пептидного транскрипційного фактора" або "сайт зв'язування транскрипційного фактора" відноситься до послідовності нуклеотидів, що зв'язує білкові транскрипційні фактори й, тим самим, контролює деякий аспект експресії послідовностей нуклеїнових кислот. Наприклад, сайти зв'язування Sp-1 й AP1 (активаторного білка 1) являють собою приклади сайтів зв'язування пептидних транскрипційних факторів.

[0094] У даному тексті термін "ген" означає послідовності дезоксирибонуклеотидів, що містять кодуючу область структурного гена. "Ген" також може містити нетрансльовані послідовності, розташовані поруч із кодуючою областю на обох 5'- і 3'-кінцях таким чином, що ген відповідає повнорозмірній мРНК. Послідовності, які розташовані з 5'-сторони від кодуючої області й які присутні на мРНК, називають 5'-нетрансльованими послідовностями. Послідовності, які розташовані з 3'-сторони або по ходу транскрипції від кодуючої області й які присутні на мРНК, називають 3'-нетрансльованими послідовностями. В обсяг терміна "ген" входить як кДНК, так і геномні форми гена. Геномна форма або клон гена містить кодуючу область, яка переривається некодуючими послідовностями названими "інтронами", або "проміжними ділянками", або "проміжними послідовностями". Інтрони являють собою фрагменти гена, які транскрибуються в гетерогенну ядерну РНК (гЯРНК); інтрони можуть містити регуляторні елементи, такі як енхансери. Інтрони віддаляються або "сплайсуються" з ядерного або первинного транскрипта; отже, інтрони відсутні в транскрипті інформаційної РНК (мРНК). Функція мРНК у процесі трансляції складається у вказівці послідовності або порядку амінокислот у поліпептиді, що утворюється.

[0095] На додаток до інтронів геномні форми гена також можуть містити послідовності, розташовані на обох 5'- і 3'-кінцях послідовностей, які присутні в транскрипті РНК. Дані послідовності називають "фланкуючими" послідовностями або ділянками (такі фланкуючі послідовності розташовані з 5'- або 3'-сторони від нетрансльованих послідовностей, що є присутніми на транскрипті мРНК). 5'-фланкуюча ділянка може містити регуляторні послідовності, такі як промотори й енхансери, які контролюють або впливають на транскрипцію гена. 3'-фланкуюча ділянка може містити послідовності, які направляють термінацію транскрипції, пост-транскрипційне розщеплення та поліаденілювання.

[0096] "Не віднесена до людини тварина" відноситься до будь-якої тварини, що не є людиною, і включають хребетних, таких як гризуни, примати, що не віднесені до людини, овеці, бичачі, жуйні, зайцеподібні, свинячі, козячі, кінські, псові, котячі, пернаті й так далі. Бажані не віднесені до людини тварини вибрані із загону гризунів. "Не віднесена до людини

тварина" додатково відноситься до амфібій (наприклад, *Xenopus*), рептилій, комах (наприклад, *Drosophila*) й інших не віднесених до ссавців видів тварин.

[0097] У даному тексті термін "трансгенний" відноситься до організму або клітини, що містить отриману з іншого організму ДНК, що після її доставки в організм або клітину вбудовується в геном соматичної та/або статевій клітини рослини або тварини. "Трансген" означає послідовність ДНК, що частково або повністю гетерологічна (тобто не є присутньою у природі) для рослини або тварини, в якому її виявили, або яка гомологічна ендogenous послідовності (тобто послідовності, що виявляють у зазначеної тварини у природі) і вбудована в зазначену рослину або тварину в положення в геномі, яке відрізняється від такого у послідовності, що зустрічається у природі. Трансгенні рослини або тварини, які містять один або більше трансгенів, входять в обсяг даного винаходу. Крім того, "трансгенний" у даній заявці відноситься до тварини, в якій модифікували й/або "нокаутували" (зробили нефункціональними або функціонуючими на зниженому рівні, тобто "нокаутуюча" мутація) один або більше генів за допомогою способів згідно з даним винаходом, шляхом гомологічної рекомбінації, мутації за допомогою TFO або за допомогою аналогічних процесів. Наприклад, у деяких варіантах реалізації трансгенний організм або клітина містить впроваджену ДНК, що включає чужорідний промотор і/або кодуючу область.

[0098] "Трансформована клітина" являє собою клітину або лінію клітин, яка одержала здатність рости в культурі протягом декількох поколінь, здатність рости в м'якому агарі, і/або клітинний ріст якої більше не інгібується міжклітинними контактами. Щодо цього, трансформація відноситься до впровадження чужорідного генетичного матеріалу в клітину або організм. Трансформацію можна здійснити за допомогою будь-якого відомого способу, що дозволяє успішно впроваджувати нуклеїнові кислоти в клітини й який призводить до експресії впровадженої нуклеїнової кислоти. "Трансформація" включає, але не обмежена такими способами, як трансфекція, мікроін'єкція, електропорація, нуклеофекція та ліпофекція (опосередкований ліпосомами перенос генів). Трансформацію можна здійснити шляхом застосування будь-якого вектора експресії. Наприклад, передбачається застосування бакуловірусу для введення чужорідної нуклеїнової кислоти в клітини комах. Термін "трансформація" також включає такі способи, як опосередкована Р-елементом трансформація зародкової лінії цілих комах. Крім того, трансформація відноситься до клітин, які виявилися трансформованими природним шляхом, зазвичай за допомогою генетичної мутації.

[0099] У даному тексті "екзогенний" означає, що ген, кодуючий білок, зазвичай не експресується в даній клітині. Крім того, "екзогенний" відноситься до гена, яким трансфікована клітина для підвищення нормального (тобто природного) рівня експресії даного гена.

[00100] Пептидна послідовність та нуклеотидна послідовність можуть бути "ендогенними" або "гетерологічними" (тобто "чужорідними"). Термін "ендогенний" відноситься до послідовності, що у природі перебуває в клітині, в яку її ввели, за умови, що вона не містить яку-небудь модифікацію у порівнянні з послідовністю, що зустрічається у природі. Термін "гетерологічний" відноситься до послідовності, що не ендogenous для клітини, в яку її ввели. Наприклад, гетерологічна ДНК містить послідовність нуклеотидів, що лігували, або на яку впливали, щоб вона стала ліговою, з послідовністю нуклеїнової кислоти, з якою вона не лігована у природі або з якою вона лігована у відмінному положенні у природі. Гетерологічна ДНК також включає послідовність нуклеотидів, що у природі перебуває в клітині, в яку її ввели, і яка містить яку-небудь модифікацію у порівнянні з послідовністю, що зустрічається у природі. Як правило, хоча й не обов'язково, гетерологічна ДНК кодує гетерологічну РНК і гетерологічні білки, які зазвичай не продукуються клітиною, в яку її ввели. Приклади гетерологічних ДНК включають репортерні гени, послідовності, що контролюють транскрипцію та трансляцію, послідовності ДНК, які кодують білки селектованих маркерів (наприклад, білки, які надають лікарську стійкість), і так далі.

Конструкції

[00101] Молекули нуклеїнових кислот, описані в даній заявці (наприклад, сайт-специфічні нуклеази або РНК-провідники для коротких поліндромних повторів, регулярно розташованих групами (CRISPR)), можна застосовувати для одержання конструкцій рекомбінантних нуклеїнових кислот. В одному варіанті реалізації молекули нуклеїнових кислот згідно з даним описом можна застосовувати для одержання конструкцій нуклеїнових кислот, наприклад, касет експресії для експресії в рослині, що цікавить. Така експресія може бути тимчасовою, наприклад, коли конструкція не вбудована в геном хазяїна, або може підтримуватися під контролем, запропонованим промотором і положенням конструкції всередині генома хазяїна, якщо вона стає вбудованою.

[00102] Касети експресії можуть містити регуляторні послідовності, функціонально пов'язані з сайт-специфічною нуклеазою або послідовностями РНК-провідників, описаними в даній заявці. Касета може додатково містити щонайменше один додатковий ген, яким потрібно котрансформувати даний організм. Як альтернатива додатковий ген(и) може перебувати на декількох касетах експресії.

[00103] Конструкції нуклеїнових кислот можна забезпечити множиною сайтів рестрикції для вставки послідовності, кодуєчої сайт-специфічну нуклеазу, під транскрипційний контроль регуляторних ділянок. Конструкції нуклеїнових кислот можуть додатково містити молекули нуклеїнових кислот, що кодують гени селектованих маркерів.

[00104] Для одержання конструкцій нуклеїнових кислот можна застосовувати будь-який промотор. Промотор може бути нативним або аналогічним, або чужорідним або гетерологічним, стосовно послідовностей нуклеїнових кислот рослини-хазяїна, описаних у даній заявці. Крім того, промотор може являти собою природну послідовність або, як альтернатива синтетичну послідовність. Якщо промотор "чужорідний" або "гетерологічний" для рослини-хазяїна, передбачається, що даний промотор не виявляють у нативній рослині, в яку впровадили зазначений промотор. У даному тексті химерний ген включає кодуєчу послідовність, функціонально пов'язану з ділянкою ініціації транскрипції, який гетерологічний кодуєчій послідовності.

[00105] Послідовності сайт-спрямованих нуклеаз, описані в даній заявці, можна експресувати, застосовуючи гетерологічні промотори.

[00106] Для одержання конструкцій для контролю експресії послідовностей сайт-спрямованих нуклеаз можна застосовувати будь-який промотор, такий як конститутивні, бажані даною тканиною, індуковані або інші промотори для експресії в рослинах. Конститутивні промотори включають, наприклад, коровий промотор Rsyn7 та інші конститутивні промотори, описані у WO 99/43 838 і патенті США № 6072050; коровий промотор 35S CaMV (Odell та ін. Nature 313:810-812; 1985); промотор актину рису (McElroy та ін., Plant Cell 2:163-171, 1990); промотор убіквітину (Christensen та ін., Plant Mol. Biol. 12:619-632, 1989 і Christensen та ін., Plant Mol. Biol. 18:675-689, 1992); pEMU (Last та ін., Theor. Appl. Genet. 81:581-588, 1991); MAS (Velten та ін., EMBO J. 3:2723-2730, 1984); промотор ALS (патент США № 5659026) і тому подібні промотори. Інші конститутивні промотори включають, наприклад, промотори, описані у патентах США № 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 і 6177611.

[00107] Бажані даною тканиною промотори можна застосовувати, щоб направляти сайт-спрямовану експресію нуклеази в конкретній тканині рослини. Такі бажані тканиною промотори включають, але не обмежені перерахованими: бажані листом промотори, бажані коренем промотори, бажані насінням промотори та бажані стеблом промотори. Бажані даною тканиною промотори включають промотори, описані в Yamamoto та ін., Plant J. 12(2):255-265, 1997; Kawamata та ін., Plant Cell Physiol. 38(7):792-803, 1997; Hansen та ін., Mol. Gen. Genet. 254(3):337-343, 1997; Russell та ін., Transgenic Res. 6(2):157-168, 1997; Rinehart та ін., Plant Physiol. 1 12(3):1331-1341, 1996; Van Camp та ін., Plant Physiol. 1 12(2):525-535, 1996; Canevascini та ін., Plant Physiol. 112(2): 513-524, 1996; Yamamoto та ін., Plant Cell Physiol. 35(5):773-778, 1994; Lam, Results Probl. Cell Differ. 20:181-196, 1994; Orozco та ін. Plant Mol Biol. 23(6):1129-1138, 1993; Matsuoka та ін., Proc Nat'l. Acad. Sci. USA 90(20):9586-9590, 1993; і Guevara-Garcia та ін., Plant J. 4(3):495-505, 1993.

[00108] Конструкції нуклеїнових кислот також можуть містити ділянки термінації транскрипції. Якщо використовують ділянки термінації транскрипції, то для одержання конструкцій нуклеїнових кислот можна застосовувати будь-яку ділянку термінації. Наприклад, ділянку термінації можна одержати з іншого джерела (тобто, чужорідного або гетерологічного для даного промотору). Приклади ділянок термінації, які доступні для застосування в конструкціях згідно з даним описом, включають ділянки термінації з плазмиди Ti A. tumefaciens, такі як ділянки термінації октопінсинтази та нопалінсинтази. Див. також Guerineau та ін., Mol. Gen. Genet. 262:141-144, 1991; Proudfoot, Cell 64:671-674, 1991; Sanfacon та ін., Genes Dev. 5:141-149, 1991; Mogen та ін., Plant Cell 2:1261-1272, 1990; Munroe та ін., Gene 91:151-158, 1990; Ballas та ін., Nucleic Acids Res. 17:7891-7903, 1989; і Joshi та ін., Nucleic Acid Res. 15:9627-9639, 1987.

[00109] У сполученні з будь-яким із аспектів, варіантів реалізації, способів і/або композицій, описаних у даній заявці, нуклеїнові кислоти можна оптимізувати для підвищеної експресії в трансформованій рослині. Тобто, нуклеїнові кислоти, що кодують білки сайт-спрямованих нуклеаз, можна синтезувати, застосовуючи бажані даною рослиною кодони для поліпшення їхньої експресії. Див., наприклад, в Campbell і Gowri (Plant Physiol. 92:1-11, 1990)

обговорення застосування переважних даним хазяїном кодонів. У даній області техніки доступні способи синтезу бажаних даною рослиною генів. Див., наприклад, патенти США № 5380831 і 5436391, і Murray та ін., *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, 1989.

[00110] Крім того, у послідовності нуклеїнових кислот, описані в даній заявці, можна ввести інші модифікації. Наприклад, відомі додаткові модифікації послідовності для підвищення рівня експресії гена в клітині-хазяїні. Такі модифікації включають виключення послідовностей, що кодують помилкові сигнали поліаденілювання, сигнали сайтів сплайсингу екзонів/ інтронів, подібні транспозонам повтори та інші подібні добре вивчені послідовності, які можуть заважати експресії генів. Вміст G-C у послідовності також можна відрегулювати до рівнів, нормальних для цільової клітини-хазяїна, які розраховують, опираючись на відомі гени, експресовані в клітині-хазяїні. Крім того, послідовність можна модифікувати, щоб уникнути утворення передбачених шпилькових вторинних структур мРНК.

[00111] Інші послідовності нуклеїнових кислот також можна застосовувати для одержання конструкцій згідно з даним описом, наприклад, для підвищення експресії послідовності, кодуючої сайт-направлену нуклеазу. Такі послідовності нуклеїнових кислот включають інтрон 1 із гена *Adhl* кукурудзи (Callis та ін., *Genes and Development* 1:1183-1200, 1987) і лідерні послідовності (*W*-послідовність) з вірусу тютюнової мозаїки (TMV), вірусу хлоротичної плямистості кукурудзи та вірусу мозаїки люцерни (Gallie та ін., *Nucleic Acid Res.* 15:8693-8711, 1987; і Skuzeski та ін., *Plant Mol. Biol.* 15:65-79, 1990). Було показано, що перший інтрон з локусу *shrunk-1* кукурудзи підвищує експресію генів у химерних генетичних конструкціях. У патентах США під номерами 5424412 і 5593874 описане застосування певних інтронів у конструкціях для експресії генів, і Gallie та ін. (*Plant Physiol.* 106:929-939, 1994) також показали, що інтрони можна застосовувати для регуляції експресії генів на тканиноспецифічній основі. Для додаткового посилення або для оптимізації експресії гена сайт-спрямованої нуклеази вектори експресії в рослинах, описані в даній заявці, також можуть містити послідовності ДНК, що містять ділянки прикріплення до ядерного матриксу (MAR). Клітини рослини, трансформовані за допомогою таких модифікованих систем експресії, потім можуть здійснювати надекспресію або конститутивну експресію послідовності нуклеотидів згідно з даним описом.

[00112] Експресійні конструкції, описані в даній заявці, також можуть містити послідовності нуклеїнових кислот, здатні направляти експресію послідовності сайт-спрямованої нуклеази в хлоропласт. Такі послідовності нуклеїнових кислот включають послідовності, що націлюють на хлоропласт, які кодують транзитний пептид хлоропласту, щоб направляти продукт гена, що цікавить, у хлоропласти клітини рослини. Такі транзитні пептиди відомі в даній області техніки. Стосовно послідовностей, що націлюють на хлоропласт, "функціонально зв'язаний" означає, що зазначена послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує транзитний пептид (тобто послідовність, що націлює на хлоропласт), з'єднана з молекулами нуклеїнових кислот сайт-спрямованої нуклеази, описаними в даній заявці, таким чином, що дві зазначені послідовності безперервні та перебувають в одній рамці зчитування. Див., наприклад, Von Heijne та ін., *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126, 1991; Clark та ін., *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550, 1989; Della-Cioppa та ін., *Plant Physiol.* 84:965-968, 1987; Romer та ін., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421, 1993; і Shah та ін., *Science* 233:478-481, 1986.

[00113] Націлюючі послідовності на хлоропласт, відомі в даній області техніки та включають малу субодиницю рибулозу-1,5-бісфосфаткарбоксилази (Rubisco) хлоропласту (de Castro Silva Filho та ін., *Plant Mol. Biol.* 30:769-780, 1996; Schnell та ін., *J. Biol. Chem.* 266(5):3335-3342, 1991); 5-(енолпірувіл)шикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS) (Archer та ін., *J. Bioenerg. Biomemb.* 22(6):789-810, 1990); триптофансинтазу (Zhao та ін., *J. Biol. Chem.* 270(11):6081-6087, 1995); пластоціанін (Lawrence та ін., *J. Biol. Chem.* 272(33):20357-20363, 1997); хоризматсинтазу (Schmidt та ін., *J. Biol. Chem.* 268(36):27447-27457, 1993); і білок зв'язуючий поглинаюче світло хлорофіл *a/b* (LHBP) (Lamppa та ін., *J. Biol. Chem.* 263:14996-14999, 1988). Див. також Von Heijne та ін., *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126, 1991; Clark та ін., *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550, 1989; Della-Cioppa та ін., *Plant Physiol.* 84:965-968, 1987; Romer та ін., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421, 1993; і Shah та ін., *Science* 233:478-481, 1986.

[00114] У сполученні з будь-яким із аспектів, варіантів реалізації, способів і/або композицій, описаних у даній заявці, конструкції нуклеїнових кислот можна одержати таким чином, щоб направити експресію мутантної послідовності кодуючої сайт-спрямовану нуклеазу, із хлоропласту клітини рослини. Способи трансформації хлоропластів відомі в даній області техніки. Див., наприклад, Svab та ін., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530, 1990; Svab і Maliga, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:913-917, 1993; Svab і Maliga, *EMBO J.* 12:601-606, 1993. Спосіб заснований на доставці за допомогою біобалістичної гармати ДНК, що містить

селектований маркер, і націлюванні даної ДНК на пластидний геном за допомогою гомологічної рекомбінації. Крім того, трансформацію пластиди можна здійснити шляхом трансактивації мовчазного трансгена, який несе пластиду, за допомогою бажаної даною тканиною експресії кодованої ядром і спрямованої у пластиду РНК-полімерази. Така система

була описана в McBride та ін. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91:7301-7305, 1994.

[00115] Цікавлячі нуклеїнові кислоти, які потрібно направити в хлоропласт, можна оптимізувати, щоб вони експресувались у хлоропласті, щоб урахувати розходження у використанні кодонів між ядром рослини та даною органелою. Таким чином, цікавлячі нуклеїнові кислоти можна синтезувати, застосовуючи переважні хлоропластом кодони. Див., наприклад, патент США № 5380831, який включений у дану заявку за допомогою посилання.

[00116] Конструкції нуклеїнових кислот можна застосовувати для трансформації клітин рослини та відтворення трансгенних рослин, що містять послідовності, кодуючі сайт-спрямовану нуклеазу. Доступна множина векторів для трансформації рослин і способів трансформації рослин. Див., наприклад, патент США № 6753458, An, G. та ін., Plant Physiol., 81:301-305, 1986; Fry, J. та ін., Plant Cell Rep. 6:321-325, 1987; Block, M., Theor. Appl. Genet. 76:767-774, 1988; Hinchey та ін., Stadler. Genet. Symp. 203:212, 1990; Cousins та ін., Aust. J. Plant Physiol. 18:481-494, 1991; Chee, P. P. і Slightom, J. L., Gene, 118:255-260, 1992; Christou та ін., Trends. Biotechnol. 10:239-246, 1992; D'Halluin та ін., Bio/Technol. 10:309-314, 1992; Dhir та ін., Plant Physiol. 99:81-88, 1992; Casas та ін., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:11212-11216, 1993; Christou, P., In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 29P:119-124, 1993; Davies, та ін., Plant Cell Rep. 12:180-183, 1993; Dong, J. A. і Mc Hughen, A., Plant Sci. 91:139-148, 1993; Franklin, C. I. і Trieu, T. N., Plant. Physiol. 102:167, 1993; Golovkin та ін., Plant Sci. 90:41-52, 1993; Guo Chin Sci. Bull. 38:2072-2078; Asano, та ін., Plant Cell Rep. 13, 1994; Ayeres N. M. і Park, W. D., Crit. Rev. Plant. Sci. 13:219-239, 1994; Barcelo та ін., Plant. J. 5:583-592, 1994; Becker, та ін., Plant. J. 5:299-307, 1994; Borkowska та ін., Acta. Physiol. Plant. 16:225-230, 1994; Christou, P., Agro. Food. Ind. Hi Tech. 5:17-27, 1994; Eapen та ін., Plant Cell Rep. 13:582-586, 1994; Hartman та ін., Bio-Technology 12:919-923, 1994; Ritala та ін., Plant. Mol. Biol. 24:317-325, 1994; і Wan, Y. C. і Lemaux, P. G., Plant Physiol. 104:3748, 1994. Клітини рослини також можна трансформувати зазначеними конструкціями, застосовуючи гомологічну рекомбінацію.

[00117] Термін "дикого типу", коли він вживається стосовно пептидної послідовності та нуклеотидної послідовності, відноситься до пептидної послідовності та нуклеотидної послідовності (локусу/гена/алелю), відповідно, яка має властивості такої пептидної послідовності та нуклеотидної послідовності, виділеної з джерела, що зустрічається у природі. Пептидна послідовність та нуклеотидна послідовність дикого типу являє собою таку послідовність, що найбільш часто зустрічається у популяції й, таким чином, довільно позначається як "нормальна" форма послідовності або пептидна послідовність та нуклеотидна послідовність "дикого типу", відповідно. "Дикого типу" також може відноситись до послідовності у певному положенні або положеннях нуклеотиду, або до послідовності у певному положенні або положеннях кодона, або до послідовності у певному положенні або положеннях амінокислоти.

[00118] "Консенсусна послідовність" являє собою послідовність амінокислот або нуклеотидів, що містить ідентичні амінокислоти або нуклеотиди, або функціонально еквівалентні амінокислоти або нуклеотиди, у щонайменше 25 % зазначеної послідовності. Ідентичні або функціонально еквівалентні амінокислоти або нуклеотиди не обов'язково повинні бути безперервними.

[00119] Термін "Brassica" у даній заявці відноситься до рослин роду капусти. Приклади видів Brassica включають, але не обмежені перерахованими: *B. carinata*, *B. elongate*, *B. fruticulosa*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. narinosa*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. perviridis*, *B. rapa* (синонім *B. campestris*), *B. rupestris*, *B. septiceps* та *B. tournefortii*.

[00120] Нуклеооснова являє собою основу, що у деяких переважних варіантах реалізації являє собою пурин, піримідин або їх похідну або аналог. Нуклеозиди являють собою нуклеооснови, 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 фосфодіефірними зв'язками, що не містять замісників, називають нуклеотидами. Термін "нуклеооснова" у даній заявці включає пептидні нуклеооснови, субодиниці пептидних нуклеїнових кислот і морфолінові нуклеооснови, а також нуклеозиди та нуклеотиди.

[00121] Олігонуклеооснова являє собою полімер, що містить нуклеооснову, переважно щонайменше частина якого може гібридизуватися шляхом спарювання основ за Уотсон-Кріком із ДНК, що має комплементарну послідовність. Ланцюг олігонуклеооснов може містити один 5'-

і один 3'-кінець, які являють собою крайні нуклеоснови полімеру. Конкретний ланцюг олігонуклеоснов може містити нуклеоснови всіх типів. Олігонуклеоснова являє собою сполуку, що містить один або більше ланцюгів олігонуклеоснов, які можуть бути комплементарні та гібридизовані шляхом спарювання основ за Уотсон-Кріком. Нуклеоснови

5 рибо-типу включають нуклеоснови, що містять пентозафуранозил, де 2'-атом вуглецю являє собою метилен, що містить як замісник гідроксил, алкілокси або галоген. Нуклеоснови дезоксирибо-типу являють собою нуклеоснови, відмінні від нуклеоснов рибо-типу, і включають всі нуклеоснови, які не містять пентозафуранозильну групу.

[00122] У деяких варіантах реалізації нитка олігонуклеоснов може включати як ланцюги олігонуклеоснов, так і фрагменти або ділянки ланцюгів олігонуклеоснов. У нитки олігонуклеоснов може бути 3'-кінець та 5'-кінець, і якщо нитка олігонуклеоснов має однакову довжину з ланцюгом, то 3'- і 5'-кінці нитки також являють собою 3'- і 5'-кінці ланцюга.

[00123] Термін "олігонуклеоснова для репарації генів" у даній заявці означає олігонуклеоснови, включаючи змішані дуплексні олігонуклеотиди, молекули, що містять не

15 стосовні до нуклеотидів молекули, одониткові олігодезоксинуклеотиди й інші молекули для репарації генів.

[00124] У даному тексті термін "кодон" відноситься до послідовності, яка складається з трьох сусідніх нуклеотидів (або РНК, або ДНК), що являє собою генетичний код, який визначає вставку конкретної амінокислоти у поліпептидний ланцюг у процесі синтезу білка або являє

20 собою сигнал зупинки синтезу білка. Термін "кодон" також застосовують стосовно відповідних (і комплементарних) послідовностей з трьох нуклеотидів в інформаційній РНК, в які транскрибується вихідна ДНК.

[00125] У даному тексті термін "гомологія" відноситься до подоби послідовностей серед білків і ДНК. Термін "гомологія" або "гомологічний" відноситься до ступеня ідентичності. Може спостерігатися як часткова гомологія, так і повна гомологія. Частково гомологічна послідовність являє собою таку послідовність, що менше ніж на 100 % ідентична іншій послідовності.

[00126] "Гетерозиготний" відноситься до знаходження різних алелей в одному або більше генетичних локусах на гомологічних фрагментах хромосом. У даній заявці

30 "гетерозиготний" також може відноситись до зразка, клітини, популяції клітин або організму, в якому можна виявити різні алелі в одному або більше генетичних локусах. Гетерозиготні зразки також можна визначити за допомогою способів, відомих у даній області техніки, таких як, наприклад, секвенування нуклеїнових кислот. Наприклад, якщо на електроферограмі секвенування виявляють два піки в одному локусі й обидва піки приблизно однакового

35 розміру, то зразок можна охарактеризувати як гетерозиготний. Або якщо один пік менше, ніж інший, але становить щонайменше приблизно 25 % від розміру більшого піка, то зразок можна охарактеризувати як гетерозиготний. У деяких варіантах реалізації менший пік становить щонайменше приблизно 15 % від розміру більшого піка. В інших варіантах реалізації менший пік становить щонайменше приблизно 10 % від розміру більшого піка. В інших варіантах реалізації менший пік становить щонайменше приблизно 5 % від розміру більшого піка. В інших варіантах реалізації виявлений мінімальний розмір меншого піка.

[00127] У даному тексті "гомозиготний" відноситься до знаходження ідентичних алелей в одному або більше генетичних локусах на гомологічних фрагментах хромосом. "Гомозиготний" також відноситься до зразка, клітини, популяції клітин або організму, в якому можна виявити

45 однакові алелі в одному або більше генетичних локусах. Гомозиготні зразки можна визначити за допомогою способів, відомих у даній області техніки, таких як, наприклад, секвенування нуклеїнових кислот. Наприклад, якщо на електроферограмі секвенування виявляють одиночний пік у конкретному локусі, то зразок можна назвати "гомозиготним" стосовно даного локусу.

[00128] Термін "гемізиготний" відноситься до гена або фрагмента гена, присутнього тільки однократно в генотипі клітини або організмі, тому що другий алель видалено. У даному тексті "гемізиготний" також може відноситись до зразка, клітини, популяції клітин або організму, в якому алель в одному або більше генетичних локусах можна виявити тільки однократно в генотипі.

[00129] Термін "статус зиготності" у даному тексті відноситься до зразка, популяції клітин або організму, що є гетерозиготним, гомозиготним або гемізиготним, що визначають за допомогою способів тестування, відомих у даній області техніки й описаних у даній заявці. Термін "статус зиготності нуклеїнової кислоти" означає визначення того, чи є джерело нуклеїнової кислоти гетерозиготним, гомозиготним або гемізиготним. "Статус зиготності" може

60 відноситись до розходжень в одному нуклеотиді у послідовності. У деяких способах статус

зиготності зразка стосовно одиначної мутації можна класифікувати як гомозиготність за диким типом, гетерозиготність (тобто один алель дикого типу й один мутантний алель), гомозиготність за мутацією або гемізиготність (тобто одна копія або алеля дикого типу, або мутантного алеля).

5 [00130] У даному тексті термін "RTDS" відноситься до системи швидкої доставки ознаки™ (RTDS), розробленої в Cibus. RTDS являє собою систему сайт-специфічної модифікації генів, тобто ефективну для внесення точних змін у послідовність гена без включення чужорідних генів або регуляторних послідовностей.

10 [00131] Термін "приблизно" у даному тексті означає в кількісному вираженні плюс або мінус 10 %. Наприклад, в обсяг терміна "приблизно 3 %" буде входити 2,7-3,3 % та в обсяг терміна "приблизно 10 %" буде входити 9-11 %.

[00132] Репараційні олігонуклеотиди

15 [00133] Даний винахід у загальному значенні відноситься до нових способів поліпшення ефективності спрямованого модифікування певних положень у геномних або інших послідовностях нуклеотидів. Крім того, даний винахід відноситься до цільового ДНК, що модифікували, мутували або позначили за допомогою підходів, описаних у даній заявці. Даний винахід також відноситься до клітин, тканин й організмів, які були модифіковані за допомогою способів згідно з даним винаходом. Даний винахід ґрунтується на розробці композицій і способів, що частково відносяться до успішної системи трансформації - системи швидкої доставки ознаки (RTDS™, Cibus US LLC).

20 [00134] RTDS заснована на зміні цільового гена шляхом застосування власної системи репарації генів клітини для специфічної модифікації послідовності гена *in situ* без вставки чужорідної ДНК і послідовностей, що регулюють експресію генів. Дана процедура дозволяє здійснити точну заміну в генетичній послідовності, при цьому інший геном залишається незмінним. На противагу звичайним трансгенним ГМО, при даному способі не відбувається вбудовування чужорідного генетичного матеріалу, а також не залишається ніякого чужорідного генетичного матеріалу в рослині. Зміни в генетичній послідовності, введені за допомогою RTDS, вводяться не довільно. Оскільки задіяні гени залишаються в нативному положенні, не виникає випадкових, неконтрольованих або несприятливих паттернів експресії.

30 [00135] RTDS, що здійснює дану заміну, являє собою хімічно синтезований олігонуклеотид, що може складатися як з основ ДНК, так і з модифікованих основ РНК, а також з інших хімічних молекул, і RTDS розроблений таким чином, щоб він гібридувався в цільовому генетичному положенні для одержання незбіжної пари основ (пара основ). Така незбіжна пара основ виступає в ролі сигналу для залучення власної природної системи репарації генів клітини в даний сайт і виправлення (заміни, вставки або делеції) зазначеного нуклеотиду(ів) у даному гені. Після завершення процесу редагування молекула RTDS деградує, і знову модифікований або репарований ген експресується під контролем нормальних ендегенних для нього механізмів.

40 [00136] Способи та композиції, описані в даній заявці, можна здійснити або зробити за допомогою "олігонуклеоснов для репарації генів" (GRON) з конформаціями та хімічними складами, докладно описаними нижче. "Олігонуклеоснови для репарації генів", представлені в даній заявці, також були описані в опублікованій науковій і патентній літературі з використанням інших назв, включаючи "рекомбіногенні олігонуклеоснови"; "химерні олігонуклеотиди РНК/ДНК"; "химерні олігонуклеотиди"; "змішані дуплексні олігонуклеотиди" (MDON); "РНК/ДНК олігонуклеотиди (RDO)"; "націлені на гени олігонуклеотиди"; "генопласти"; "однориткові модифіковані олігонуклеотиди"; "однориткові олігодезоксинуклеотидні мутаційні вектори" (SSOMV); "дуплексні мутаційні вектори" та "гетеродуплексні мутаційні вектори". Олігонуклеоснову для репарації генів можна ввести в клітину рослини, застосовуючи будь-який спосіб, широко використовуваний у даній області техніки, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: мікроносії (біолістичну доставку), мікроволокна, опосередковане поліетиленгліколем (ПЕГ) поглинання, електропорацію та мікроін'єкцію.

50 [00137] В одному варіанті реалізації олігонуклеоснова для репарації генів являє собою змішані дуплексні олігонуклеотиди (MDON), при цьому нуклеотиди РНК-типу змішаного дуплексного олігонуклеотиду роблять стійкими до РНКзи шляхом заміни 2'-гідроксилу на функціональну групу фтору, хлору або броду або шляхом додавання замісника для 2'-О. Підходящі замісники включають замісники, описані в Kmies 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 даним включені в дану заявку за допомогою посилання. У даному тексті похідна рибонуклеотиду з 2'-фтором, хлором або бромом або рибонуклеотид, у якому Т-ОН заміщена на замісник,

описаний в Martin Applications або Sproat, називають "2'-заміщеним рибонуклеотидом". У даному тексті 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, який не містить замісники, або будь-яких із штучних засобів з'єднання, описаних в Kmies I або Kmies II. У даному тексті термін "нуклеотид дезоксирибо-типу" означає нуклеотид, що містить Т-Н, що може бути з'єднаний з іншими нуклеотидами олігонуклеоснови для репарації генів за допомогою фосфодієфірного зв'язку, який не містить замісники, або будь-якого з штучних засобів з'єднання, описаних в Kmies I або Kmies II.

[00138] У деякому варіанті реалізації даного винаходу олігонуклеоснова для репарації генів являє собою змішаний дуплексний олігонуклеотид (MDON), що з'єднаний винятково фосфодієфірними зв'язками, які 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 Kmies II. У ще одному варіанті реалізації кожен 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, які не містять замісників.

[00139] Хоча змішані дуплексні олігонуклеотиди (MDON), що містять 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 кепа", 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.

[00140] Перша та друга нитки містять дві ділянки, які гомологічні двом фрагментам цільового гена, 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, ідентична довжині гетерологічної ділянки, в якій 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.

[00141] 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 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".

[00142] В іншому варіанті реалізації даного винаходу олігонуклеосонова для репарації генів (GRON) являє собою одонитковий олігодезоксинуклеотидний мутаційний вектор (SSOMV), що описаний у міжнародній заявці на патент PCT/USOO/23457, у патентах США під номерами 6271360, 6479292 і 7060500, які повністю включені 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 і WO 99/40789. 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 послідовність. Така мутаторна ділянка може викликати заміну. Як альтернатива гомологічні ділянки в SSOMV можуть безупинно слідувати одна за одною, тоді як ділянки в цільовому гені, що мають однакові послідовності, можуть бути розділені одним, двома або більше нуклеотидами. Такий SSOMV викликає делецію в цільовому гені нуклеотидів, які відсутні в SSOMV. Нарешті, послідовність цільового гена, що ідентична гомологічним ділянкам, може бути безперервна в цільовому гені, але розділена одним, двома або більше нуклеотидами у послідовності SSOMV. Такий SSOMV викликає вставку в послідовність цільового гена.

[00143] 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. 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 дезоксинуклеотидів.

[00144] 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 як мутаторний нуклеотид, так і цільовий нуклеотид являли собою піримідин. У тих випадках, коли це відповідає досягненню необхідного функціонального результату, переважно, щоб як мутаторний нуклеотид, так і цільовий 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.

[00145] Підвищення ефективності.

[00146] У даному винаході описана множина підходів для підвищення ефективності зміни цільового гена із застосуванням репараційних олігонуклеотидів, які можна застосовувати окремо або в комбінації один з одним. Такі підходи включають:

1. Введення в репараційні олігонуклеотиди модифікацій, які залучають апарат репарації ДНК до цільового (незбіжного) сайту.

А. Включення одного або більше сайтів з вилученими основами в олігонуклеотид (наприклад, у межах 10 основ, і більш переважно з 5 основами переважної ділянки розбіжності) створює ушкодження, що є перехідним при ексцизійній репарації основ (BER), і яке залучає апарат BER в околицю сайту, що підлягає зміні за допомогою олігонуклеотиду для репарації.

Модифіковані олігонуклеотиди dSpacer (фуран з вилученою основою) можна одержати, як описано, наприклад, в Takeshita та ін., J. Biol. Chem., 262:10171-79, 1987.

В. 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 з цинковими пальцями, FokI (або будь-який клас ферментів рестрикції типу IIS) та 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 й інші антибіотики.

С. Включення в олігонуклеотид одного або більше 8'-окси-dA або -dG (наприклад, у межах 10 основ, і більш переважно з 5 основами переважної ділянки розбіжності) створює ушкодження, що аналогічно ушкодженням, викликаним активними формами кисню. Дані ушкодження індують так звану систему "репарації виштовхування". Див., наприклад, Kim та ін., J. Biochem. Mol. Biol. 37:657-62, 2004.

2. Підвищення стабільності репараційних олігонуклеотидів:

Включення переверненої основи (idC) в 3'-кінець олігонуклеотиду для одержання 3'-блокованого кінця на олігонуклеотиді для репарації.

Включення одного або більше 2'-О-метил-нуклеотидів або основ, які підвищують енергію гібридизації (див., наприклад, WO 2007/073149) в 5'- і/або 3'-кінець олігонуклеотиду для репарації.

Включення множини 2'-О-метил-РНК-нуклеотидів в 5'-кінець олігонуклеотиду для репарації, що призводить до одержання основ ДНК, які створюють бажаний сайт розбіжності, у результаті чого утворюється подібна до фрагмента Оказакі структура нуклеїнової кислоти.

Кон'югування (з 5'- або 3'-кінцем) інтеркалюючих барвників, таких як акридин, псорален, бромистий етидій і барвники Syber.

Додавання 5'-кінцевого кепу, такого як T/A затиск, молекули холестерину, SIMA (HEX), riboC й амідиту.

Модифікування кістяка, наприклад, за допомогою фосфотіоату, 2'-О метилу, метилфосфонатів, замкненої нуклеїнової кислоти (ЗНК), МОЕ (метоксіетилу), ди-PS і пептидної нуклеїнової кислоти (ПНК).

Перефресне зшивання олігонуклеотиду для репарації, наприклад, за допомогою реагентів внутрішньоланцюгового перефресного зшивання, таких як цисплатин і мітоміцин С.

Кон'югування з флуоресцентними барвниками, такими як Cy3, DY547, Cy3.5, Cy3B, Cy5 і DY647.

3. Підвищення енергії гібридизації олігонуклеотиду для репарації за допомогою включення основ, які підвищують енергію гібридизації (див., наприклад, WO 2007/073149).

4. Підвищення якості синтезу олігонуклеотиду для репарації шляхом застосування мультимерів (димерів, тримерів, тетрамерів і так далі) нуклеотиду як будівельні блоки для синтезу. У результаті цього потрібна менша кількість етапів з'єднання, і легше відокремити повнорозмірні продукти від будівельних блоків.

5. Застосування довгих репараційних олігонуклеотидів (тобто довжиною більше ніж 55 нуклеотидів, переважно довжиною від 75 до 300 нуклеотидів, більш переважно довжиною щонайменше 100 нуклеотидів, ще більш переважно довжиною щонайменше 150 нуклеотидів і найбільше переважно довжиною щонайменше 200 нуклеотидів), переважно з двома або більше мутаціями, на які націлений олігонуклеотид для репарації.

[00147] Приклади описаних вище підходів передбачені в наступній таблиці.

[00148] Таблиця 1. Хімічні склади GRON для дослідження.

[00149]

	Тип олігонуклеотиду	Модифікації
Модифікації 5'	T/A затиск	T/A затиск
Модифікації кістяка	Фосфотіоат	PS
Інтеркалюючі барвники	5'-акридин-3'	idC-акридин, idC
Фрагменти Оказакі		ДНК/РНК
Заміни Су3		DY547
Фасилітатори	2'-ОМе олігонуклеотиди, сконструйовані з 5'- і 3'- сторони від перетворюючого олігонуклеотиду	2'-ОМе
Вилучена основа	Сайт із вилученою основою поміщали в різні положення 5'- і 3'- сторони від перетворюючої основи. 44-мір	Вилучена основа 2
Допоміжний	Допоміжний підхід Перекривання: 2 олігонуклеотиди: 1 з Су3/idC, 1 немодифікований олігонуклеотид для репарації	Су3, idC на одній, на іншій нічого:
Допоміжний	Допоміжний підхід Без перекривання: 2 олігонуклеотиди: 1 з Су3/idC, 1 немодифікований олігонуклеотид для репарації	Тільки одержання немодифікованого олігонуклеотиду
Вилучена основа	Сайт ТГФ поміщали в різні положення з 5'- і 3'- сторони від перетворюючої основи. 44-мір	Тетрагідрофуран (dspacer)
Модифікації кістяка	9	2'-ОМе
Тримери		Амідити тримеру, Су3, idC
Репарація виштовхування		8'-окси-dA, 5' Су3, idC
Репарація виштовхування		8'-окси-dA, 5' Су3, idC
Двонитковий розрив		Блеоміцин
Крослінкер		Цисплатин
Крослінкер		Мітоміцин С
Фасилітатори	супероснови з 5'- і 3'- сторони від перетворюючого олігонуклеотиду	2-аміно-dA та 2-thio-T
Суперолігонуклеотиди		2'-аміно-d, 5'-Су3, idC
Суперолігонуклеотиди		2-thio-T, 5'-Су3, idC
Суперолігонуклеотиди		7-деаза-A, 5'-Су3, idC

	Тип олігонуклеотиду	Модифікації
Суперолігонуклеотиди		7-деаза-G, 5'-Cy3, idC
Суперолігонуклеотиди		Пропаніл-dC, 5'-Cy3, idC
Інтеркалюючі барвники	5'-псорален/3'-idC	Псорален, idC
Інтеркалюючі барвники	5'-бромистий етидій	
Інтеркалюючі барвники	5'-барвники Syber	
Модифікації 5'	5'-Холестерин/3'-idC	Холестерин
Подвійна мутація	Довгий олігонуклеотид (100 основ) w/ 2 мутації	Невідома
Модифікації 5'	5'-SIMA HEX/3'-idC	SIMA HEX, idC
Модифікації кістяка	9	Метилфосфонати
Модифікації кістяка		LNA (замкнена нуклеїнова кислота)
Модифікації кістяка	1	МОЕ (метоксіетил)
Заміни Cy3		Cy3.5
Заміни Cy3		Cy5
Модифікації кістяка		Ди-PS
Модифікації 5'		гібо для pm гілки
Модифікації кістяка		ПНК
Заміни Cy3		DY647
Модифікації 5'	5'-гілка	Симетрична гілка амідит/idC

[00150] Перераховані вище модифікації також можуть включати відомі модифікації нуклеотидів, такі як метилювання, 5'-інтеркалюючі барвники, модифікації 5'- і 3'-кінців, модифікації каркаса, крослінкери, циклізацію та кепи, і заміну одного або більше з нуклеотидів, що зустрічаються у природі, на аналогічний, такий як інозин. Модифікації нуклеотидів включають вставки акридину, аміну, біотину, cascade blue, холестерину, Cy3TM, Cy5TM, Cy5.5TM, дабцилу, дигоксигеніну, динітрофенілу, Edans, 6-FAM, флуоресцеїну, 3'-гліцерилу, HEX, IRD-700, IRD-800, JOE, фосфату псорален, родаміну, ROX, тіолу (SH), спейсерів, TAMRA, TET, AMCA-STM, SE, BODIPYTM, Marina BlueTM, Pacific BlueTM, Oregon GreenTM, родамінового зеленогоTM, родамінового червоногоTM, Rhodol GreenTM і техаського червоногоTM. Модифікації поліонуклеотидного кістяка включають метилфосфонат, 2'-ОМе-метилфосфонат-ПНК, фосфотіоат-ПНК, 2'-ОМе-ПНК. Модифікації основ включають 2-аміно-dA, 2-амінопурин, 3'-(ddA), 3'-dA (кордицепін), 7-деазу-dA, 8-Br-dA, 8-оксо-dA, N6-Me-dA, сайт із вилученою основою (dSpacer), біотин-dT, 2'-ОМе-5Me-C, 2'-ОМе-пропініл-C, 3'-(5-Me-dC), 3'-(ddC), 5-Br-dC, 5-1-дус, 5-Me-dC, 5-F-dC, карбокси-dT, оборотний dA, оборотний dC, оборотний dG, оборотний dT, оборотний dU, 7-деаза-dG, 8-Br-dG, 8-окси-dG, O6-Me-dG, S6-днп-dG, 4-метиліндол, 5-нітроіндол, 2'-ОМе-інозин, 2'-dT об-феніл-dT, 4-метиліндол, 2'-дезоксинебуларин, 5-нітроіндол, 2-амінопурин, dP (аналог пурину), dK (аналог піримідину), 3-нітропірол, 2'-тіо-dT, 4-тіо-dT, біотин-dT, карбокси-dT, O4-Me-dT, O4-триазол-dT, 2'-ОМе-пропініл-U, 5-Br-dU, 2'-dU, 5-F-dU, 5-I-dU, O4-триазол-dU. В обсяг зазначених термінів також входять пептидні нуклеїнові кислоти (ПНК), аналог ДНК, у якому кістяк являє собою псевдопептид, що складається з одиниць N-(2-аміноетил)-гліцину замість цукру. ПНК імітують поведження ДНК і зв'язуються з комплементарними нитками нуклеїнових кислот. Нейтральний кістяк ПНК призводить до більш

сильного зв'язування та більшої специфічності, ніж досягається зазвичай. Крім того, унікальні хімічні, фізичні та біологічні властивості ПНК застосовувалися для одержання ефективних біомолекулярних засобів, антизначеннєвих й антигенних агентів, молекулярних зондів і біосенсорів.

[00151] Олігонуклеосоми можуть містити одонитковий(и) розрив(и), геп(и), модифіковані нуклеотиди, такі як модифіковані олігонуклеотидні кістяки, нуклеотиди, позбавлені азотистої основи, або інші хімічні молекули. У додатковому варіанті реалізації щонайменше одна нитка олігонуклеосоми містить щонайменше один додатковий модифікований нуклеотид, наприклад, 2'-О-метил-модифікований нуклеотид, такий як МОЕ (метоксіетил), нуклеотид, що містить 5'-фосфотіоатну групу, кінцевий нуклеотид, з'єднаний з холестерильною похідною, 2'-дезоксид-2'-фтор-модифікований нуклеотид, 2'-дезоксид-модифікований нуклеотид, замкнений нуклеотид, нуклеотид з вилученою основою (нуклеосома відсутня або замість неї є присутньою гідроксильна група (див., наприклад, Glen Research, <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR21-14.html>)), 2'-аміно-модифікований нуклеотид, 2'-алкіл-модифікований нуклеотид, морфолін-нуклеотид, фосфорамідит і нуклеотид, що містить штучну основу. Сюди також включені різні солі, змішані солі та вільні кислоти.

[00152] Переважні модифіковані олігонуклеотидні кістяки включають, наприклад, фосфотіоати, хіральні фосфотіоати, фосфодитіоати, фосфотриєфіри, 20 аміноалкілфосфотриєфіри, метил- та інші алкілфосфонати, включаючи 3'-алкіленфосфонати, 5'-алкіленфосфонати та хіральні фосфонати, фосфінати, фосфорамідати, включаючи 3'-амінофосфорамідат й аміноалкілфосфорамідати, тіонофосфорамідати, тіоноалкілфосфонати, тіоноалкілфосфотриєфіри, селенофосфати та боранофосфати з нормальними 3'-5' зв'язками, їхні аналоги з 2'-5' зв'язками, і з'єднання зі зворотною полярністю, в яких один або більше зв'язків між нуклеотидами являє собою 3'-3', 5'-5' або 2'-2' зв'язки. Переважні олігонуклеотиди 25 зі зворотною полярністю містять один зв'язок 3'-3' між нуклеотидами в найближчому до 3'-кінця положенні, тобто один зворотний нуклеозидний залишок, у якого може бути вилучена основа (нуклеосома відсутня або замість неї є присутньою гідроксильна група). Найбільш частим застосуванням зворотного зв'язку є додавання зв'язку 3'-3' до кінця антизначеннєвого олігонуклеотиду з фосфотіоатним кістяком. Зв'язок 3'-3' додатково захищає антизначеннєвий олігонуклеотид від руйнування екзонуклеазою шляхом створення олігонуклеотиду з двома 5'-ОН кінцями та без 3'-ОН кінця. Зворотні зв'язки можна ввести у певні положення у процесі синтезу олігонуклеотиду шляхом застосування "зворотних фосфорамідитів". Дані реагенти 30 містять фосфорамідитні групи у положенні 5'-ОН і захисну групу диметокситриптілу (DMT) у положенні 3'-ОН. Зазвичай, захисна група DMT перебуває на 5'-ОН і фосфорамідит перебуває на 3'-ОН.

[00153] Приклади модифікованих основ включають, але не обмежені перерахованими: 2-амінопурин, 2'-амінобутирилпіренуридин, 2'-аміноуридин, 2'-дезоксіуридин, 2'-фторцитидин, 2'-фторуридин, 2,6-діамінопурин, 4-тіоуридин, 5-бромурин, 5-фторцитидин, 5-фторуридин, 40 5-індоуридин, 5-метилцитидин, інозин, N3-метилуридин, 7-деазо-гуанін, 8-аміногексиламіноаденін, 6-тіогуанін, 4-тіотимін, 2-тіотимін, 5-йодоуридин, 5-йодоцитидин, 8-бромгуанін, 8-бромаденін, 7-деазааденін, 7-діазагуанін, 8-оксогуанін, 5,6-дигідроуридин і 5-гідроксиметилуридин. Дані синтетичні одиниці доступні для придбання (наприклад, їх можна придбати в Glen Research Company); і їх можна включити в ДНК шляхом хімічного синтезу.

[00154] Приклади модифікації молекули цукру являють собою 3'-дезоксилування, 2'-фторування й арабінозидування, проте, вони не повинні розглядатися як обмежені перерахованими модифікаціями. Включення таких модифікацій у ДНК також можливо шляхом хімічного синтезу.

[00155] Приклади модифікацій 5'-кінця являють собою 5'-амінування, 5'-біотинілювання, 5'-флуоресцеїнування, 5'-тетрафторфлуоресцеїнування, 5'-тіонування та 5'-дабсилування, проте вони не повинні розглядатися як обмежені перерахованими модифікаціями.

[00156] Приклади модифікацій 3'-кінця являють собою 3'-амінування, 3'-біотинілювання, 2,3-дидеокидування, 3'-тіонування, 3'-дабсилування, 3'-карбоксилування та 3'-холестеринування, проте, вони не повинні розглядатися як обмежені перерахованими модифікаціями.

[00157] В одному переважному варіанті реалізації олігонуклеосома може містити 5'-блокуючий замісник, що приєднаний до 5'-кінцевих атомів вуглецю за допомогою лінкера. Хімічна природа лінкера не є критичною, на відміну від його довжини, що переважно повинна становити щонайменше 6 атомів, і сам лінкер повинен бути гнучким. Можна застосовувати 60 різні нетоксичні замісники, такі як біотин, холестерин або інші стероїди або неінтеркалюючий

катіонний флуоресцентний барвник. Особливо переважними як реагенти для одержання олігонуклеоснов є реагенти під торговельними найменуваннями Cy3™ і Cy5™ в Glen Research (тепер GE Healthcare), Стерлінг, Віргінія, 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 особливо переважним. Якщо індокарбоціанін містить як замісник N-оксіалкіл, його можна зручно з'єднати з 5'-кінцем олігодезоксинуклеотиду як фосфодієфір з 5'-кінцевим фосфатом. Якщо використовують доступний для придбання фосфорамідит Cy3, як зазначено, то отримана 5'-модифікація складається з блокуючого замісника та лінкера разом, які являють собою N-гідроксипропіл, N'-фосфатидилпропіл, 3,3',3',3'-тетраметил-індомонокарбоціанін. Інші запропоновані барвники включають родамін 6G, тетраметилродамін, сульфородамін 101, мероціанін 540, Atto565, Atto550 26, Cy3.5, Dy547, Dy548, Dy549, Dy554, Dy555, Dy556, Dy560, mStrawberry та mCherry.

[00158] 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.

[00159] Конструкції олігонуклеотидів, описані в даній заявці, також можна застосовувати в якості більш ефективних донорних матриць у комбінації з іншими методиками редагування або рекомбінації ДНК, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: спрямований вплив на гени із застосуванням сайт-специфічної гомологічної рекомбінації за допомогою нуклеаз із цинковими пальцями, ефекторні нуклеази, подібні до активаторів транскрипції (TALEN), або короткі поліндомні повтори, регулярно розташовані групами (CRISPR).

[00160] Даний винахід у загальному значенні відноситься до способів ефективної модифікації геномної клітинної ДНК і/або рекомбінації ДНК у геномну ДНК клітин. Хоча способи згідно з даним винаходом не обмежені яким-небудь конкретним застосуванням, вони корисні, наприклад, для введення модифікації в геном клітини з метою визначення впливу даної модифікації на клітину. Наприклад, модифікацію можна ввести у послідовність нуклеотидів, що кодує фермент, щоб визначити, чи змінює дана модифікація ферментативну активність зазначеного ферменту, і/або щоб визначити положення каталітичної області ферменту. Як альтернатива модифікацію можна ввести у кодуючу послідовність ДНК-сполучного білка, щоб визначити, чи зміниться ДНК-сполучна активність даного білка, і, таким чином, встановити конкретну ДНК-сполучну область всередині даного білка. Як інша альтернатива можна ввести модифікацію в не кодуючу регуляторну послідовність (наприклад, у промотор, енхансер, регуляторну послідовність РНК (міРНК) і так далі), щоб визначити вплив даної модифікації на рівень експресії другої послідовності, що функціонально пов'язана з не кодуючою регуляторною послідовністю. Це може знадобитися, наприклад, для визначення конкретної послідовності, що має регуляторну активність.

[00161] Одна стратегія для спрямованого порушення гена полягає в утворенні одониткових або двониткових розривів 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.

[00162] Хомінг-ендонуклеази, також відомі як мегануклеази, являють собою сайт-специфічні ендонуклеази, які утворюють двониткові розриви в геномній ДНК з високим ступенем специфічності завдяки більшим (наприклад, > 14 п.о.) сайтам розщеплення. Незважаючи на те, що специфічність хомінг-ендонуклеаз до цільових сайтів дозволяє точне позиціювання індукованих розривів ДНК, сайти розщеплення хомінг-ендонуклеазами зустрічаються рідко й імовірність виявлення розщеплення, що зустрічається у природі сайту, у цільовому гені низька.

[00163] 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.

[00164] 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.

[00165] 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.

[00166] 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.

[00167] 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.

[00168] Інший клас штучних ендонуклеаз являє собою сконструйовані мегануклеази. 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.

[00169] У спрямованій рекомбінації генів можна застосовувати інші модифікуючі ДНК молекули. Наприклад, можна застосовувати пептидні нуклеїнові кислоти, щоб викликати модифікації в геномі цільової клітини або клітин (див., наприклад, патент США номер 5986053, Eskeg, включений у дану заявку за допомогою посилання). Коротко, синтетичні нуклеотиди, що містять щонайменше частково пептидний кістяк, застосовують для націлювання на гомологічну геномну послідовність нуклеотидів. Після зв'язування з двоспіральною ДНК, або за допомогою мутагену, лігovanого з пептидною нуклеїною кислотою, відбувається модифікація цільової послідовності ДНК і/або рекомбінація. Специфічність націлювання визначається ступенем гомології між послідовністю, що націлює, і геномною послідовністю.

[00170] Більше того, даний винахід не обмежений конкретними способами, які застосовуються в даній заявці для модифікації геномних послідовностей. У дійсності, передбачається множина способів. Наприклад, націлювання на гени можна здійснити, застосовуючи олігонуклеотиди, що утворюють потрійну спіраль (TFO). TFO можна одержати синтетичним шляхом, наприклад, за допомогою ПЛР або шляхом застосування пристрою, що синтезує гени. Крім того, TFO можна виділити з геномної ДНК, якщо виявлені підходящі природні послідовності. TFO можна застосовувати множиною способів, включаючи, наприклад, шляхом приєднання до мутагену, такого як, але не обмежуючись перерахованими: псорален або хлорамбуцил (див., наприклад, Havre та ін., *Proc Nat'l Acad Sci, U.S.A.* 90:7879-7883, 1993; Havre та ін., *J Virol* 67:7323-7331, 1993; Wang та ін., *Mol Cell Biol* 15:1759-1768, 1995; Takasugi та ін., *Proc Nat'l Acad Sci, U.S.A.* 88:5602-5606, 1991; Belousov та ін., *Nucleic Acids Res* 25:3440-3444, 1997). Більше того, наприклад, TFO можна приєднати до донорного дуплекса ДНК (див., наприклад, Chan та ін., *J Biol Chem* 272:11541-11548, 1999). TFO також можуть діяти шляхом зв'язування з достатньою афінністю, щоб викликати репарацію, яка допускає помилки (Wang та ін., *Science* 271:802-805, 1996).

[00171] 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: індокарбазоли, нафталіндіїмід (NDI), трансплатин, блеоміцин, аналоги циклопропапіролоіндолу та фенантродигідродіоксини. Зокрема, індокарбазоли являють собою інгібітори топоізомерази 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 з 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).

[00172] У даному винаході передбачаються інші способи індукції модифікацій і/або рекомбінації. Наприклад, інший варіант реалізації включає індукцію гомологічної рекомбінації між екзогенним фрагментом ДНК і цільовим геном (див., наприклад, Саресчі та ін., *Science* 244:1288-1292, 1989) шляхом застосування пептидних нуклеїнових кислот (ПНК) з афінністю до цільового сайту. Інші додаткові способи включають сайт-специфічні впізнавання та націлювання на ДНК за допомогою поліамідів (див., наприклад, Dervan та ін., *Curr Opin Chem Biol* 3:688-693, 1999; *Biochemistry* 38:2143-2151, 1999) і шляхом застосування нуклеаз із сайт-специфічною активністю (наприклад, білків із цинковими пальцями, TALEN, мегануклеаз і/або CRISPR).

[00173] Даний винахід не обмежений якою-небудь конкретною частотою модифікації та/або рекомбінації. Способи згідно з даним винаходом призводять до частоти модифікації цільової послідовності нуклеотидів від 0,2 % до 3 %. Проте, передбачається, що будь-яка частота (тобто між 0 % і 100 %) модифікації та/або рекомбінації входить в обсяг даного винаходу. Частота модифікації та/або рекомбінації залежить від способу, застосовуваного для індукції модифікації та/або рекомбінації, від застосовуваного типу клітин, конкретного цільового гена та застосовуваного мутуючого ДНК реагенту, якщо його використовують. Крім того, спосіб, використовуваний для виявлення модифікації та/або рекомбінації, внаслідок обмежень способу детектування, не може виявити всі виниклі модифікації та/або рекомбінації. Більш того, деякі події модифікації та/або рекомбінації можуть бути мовчазними і не проявляти детектованих ознак того, що дана модифікація та/або рекомбінація відбулася. Неможливість виявити мовчазні події модифікації та/або рекомбінації призводить до заниженої оцінки модифікації та/або рекомбінації. За даними й іншими причинами даний винахід не обмежений якою-небудь конкретною частотою модифікацій і/або рекомбінацій. В одному варіанті реалізації частота модифікацій і/або рекомбінацій становить від 0,01 % до 100 %. В іншому варіанті реалізації частота модифікацій і/або рекомбінацій становить від 0,01 % до 50 %. У ще одному варіанті реалізації частота модифікацій і/або рекомбінацій становить від 0,1 % до 10 %. У ще одному варіанті реалізації частота модифікацій і/або рекомбінацій становить від 0,1 % до 5 %.

[00174] У даному тексті термін "частота мутацій" стосовно популяції клітин, які оброблені модифікуючою ДНК молекулою, що здатна вводити мутацію в цільовий сайт генома клітини, відноситься до кількості клітин в обробленій популяції, які містять дану мутацію в цільовому сайті, стосовно загальної кількості клітин, які оброблені модифікуючою ДНК молекулою. Наприклад, стосовно популяції клітин, що оброблена модифікуючою ДНК молекулою TFO, що приєднана до псоралену, розробленої таким чином, щоб вона вводила мутацію в цільовий сайт генома клітини, частота мутацій, рівна 5 %, означає, що з кожних 100 клітин, які оброблені TFO-псораленом, 5 клітин містять мутацію в цільовому сайті.

[00175] Хоча даний винахід не обмежений яким-небудь ступенем точності при модифікації та/або рекомбінації ДНК у клітині, передбачається, що в деяких варіантах реалізації даного винаходу потрібен більш високий ступінь точності, залежно від бажаного результату. Наприклад, для певних змін послідовності, необхідних для репарації генів (наприклад, для зміни певної основи), потрібен більше високий ступінь точності у порівнянні з одержанням нокауту гена, при якому необхідно лише порушення гена. При застосуванні способів згідно з даним винаходом досягаються більш високі рівні точності в методиках модифікації та/або гомологічної рекомбінації, ніж при застосуванні способів відомого рівня техніки.

[00176] Доставка олігонуклеоснов для репарації генів у клітини рослини

[00177] Для доставки олігонуклеоснов для репарації генів можна застосовувати будь-який широко відомий спосіб, застосовуваний для трансформації клітини рослини. Приклади способів перераховані нижче. У даному винаході передбачається множина способів трансфекції клітин модифікуючим ДНК реагентом або реагентами. У дійсності, даний винахід не обмежений яким-небудь конкретним способом. Способи введення модифікуючих ДНК реагентів у клітину або клітини добре відомі в даній області техніки та включають, але не обмежені перерахованими: мікроін'єкцію, електропорацію, пасивну адсорбцію, копреципітацію ДНК із фосфатом кальцію, опосередковану ДЕАЕ-декстраном трансфекцію, опосередковану полібреном трансфекцію, злиття ліпосом, трансфекцію ліпофектином, нуклеофекцію, злиття протопластів, ретровірусну інфекцію, біолістичну трансфекцію (тобто бомбардування частинками) і тому подібні способи.

[00178] Застосування металевих мікроносіїв (мікросфер) для впровадження більших фрагментів ДНК у клітини рослини, що мають целюлозні клітинні стінки, шляхом металевих проникнення (далі називаного біолістичною доставкою) добре відомі фахівцям у відповідній області техніки. У патентах США під номерами 4945050; 5100792 і 5204253 описані основні методики вибору мікроносіїв і пристроїв для їхнього проектування.

[00179] 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 CaCl_2 й 0,1 М спермідин додають у зазначеному порядку; суміш обережно перемішують, наприклад за допомогою струшування, протягом 10 хвилин, а потім 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 CaCl_2 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 CaCl_2 і 21 мМ спермідину.

[00180] Олігонуклеоснови для репарації генів 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 карбиду кремнію 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 мікроволокон, можна використовувати для доставки олігонуклеоснов для репарації генів для трансмутації.

[00181] Наочний спосіб мікроволоконної доставки олігонуклеоснови для репарації генів описаний далі. Стерильні мікроволокна (2 мкг) суспендують в 150 мкл рослинному культуральному середовищі, що містить приблизно 10 мкг змішаного дуплексного олігонуклеотиду. Суспензійній культурі дають можливість відстоятися, 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 з затримкою аж до приблизно 120 годин, у міру доцільності для конкретної властивості.

[00182] В альтернативному варіанті реалізації олігонуклеоснови для репарації генів можна доставляти в клітину рослини шляхом електропорації протопласту, отриманого з частини рослини. Протопласти одержують шляхом ферментативної обробки частини рослини, зокрема, листа, відповідно до методик, які добре відомі середньому фахівцю в даній області техніки. 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. Протопласти не обов'язково потрібно культивувати в ростових середовищах перед електропорацією. Типові умови для електропорації наступні:

3 × 10⁵ протопластів у загальному обсязі 0,3 мл при концентрації олігонуклеосови для репарації генів у діапазоні 0,6-4 мкг/мл.

[00183] В альтернативному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти поглинаються протопластами рослини у присутності агента, що модифікує мембрану, поліетиленгліколя відповідно до методик, добре відомих фахівцям у даній області техніки. В альтернативному варіанті реалізації олігонуклеосови для репарації генів можна доставити шляхом впорскування через мікрокапіляр у клітини рослини або у протопласти.

[00184] В альтернативному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти укладені в мікрогранули, що складаються з альгілату кальцію, і поглинаються протопластами рослини у присутності агента, що модифікує мембрану, поліетиленгліколя (див., наприклад, Sone та ін., 2002, Liu та ін., 2004).

[00185] В альтернативному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти заморожують у воді та вводять у клітини рослини у вигляді мікрочастинок шляхом бомбардування (див., наприклад, Gilmore, 1991, патент США № 5219746; Brinegar та ін.).

[00186] В альтернативному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти, приєднані до наночастинок, вводять в інтактні клітини рослини шляхом інкубації клітин у суспензії, що містить наночастинок (див., наприклад, Pasupathy та ін., 2008), або шляхом доставки в інтактні клітини за допомогою бомбардування частинками або у протопласти шляхом спільної інкубації (див., наприклад, Torney та ін., 2007).

[00187] В альтернативному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти в комплексі з проникаючими пептидами й доставляють у клітини шляхом спільної інкубації (див., наприклад, Chugh та ін., 2008, WO 2008148223 A1; Eudes i Chugh).

[00188] В альтернативному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти вводять в інтактні клітини шляхом електропорації (див., наприклад, He та ін., 1998, US 2003/0115641 A1, Dobres та ін.).

[00189] В альтернативному варіанті реалізації нуклеїнові кислоти доставляють у клітини сухих зародків шляхом їхнього вимочування в розчині з нуклеїновими кислотами (шляхом вимочування сухих зародків (див., наприклад, Töpfer та ін., 1989, Senaratna та ін., 1991)).

[00190] Селекція рослин

[00191] 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, 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, лілія, і рослини, що дають горіхи, якщо вони ще конкретно не згадані.

[00192] 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.

[00193] У тексті даної заявки по суті нормальний ріст рослини, органу рослини, тканини рослини або клітини рослини являє собою 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.

[00194] У даній заявці по суті нормальний розвиток рослини, органу рослини, тканини рослини або клітини рослини являє собою 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.

[00195] У деяких варіантах реалізації органи рослини, представлені в даній заявці, включають, але не обмежені перерахованими: листи, 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.

[00196] 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.

[00197] Одержання рослин.

[00198] Відомі способи культивування різних тканин різних видів рослини та регенерації рослин із них. Наприклад, нарощування 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.

[00199] 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.

[00200] ПРИКЛАДИ

[00201] Приклад 1. Довжина GRON

[00202] В Sommer та ін. (Mol Biotechnol. 33:115-22, 2006) описана репортерна система для виявлення зміни генів in vivo, що ґрунтується на зміні одного нуклеотиду, що призводить до перетворення синьої та зеленої флуоресценції у варіантах зеленого флуоресцентного білка (GFP). Така репортерна система придатна для застосування в наступних експериментах з використанням Arabidopsis thaliana як модельний вид, щоб оцінити ефективність перетворення GRON після модифікації довжини GRON.

[00203] Коротко, для даного та наступного прикладів одержували лінію Arabidopsis з декількома копіями гена синього флуоресцентного білка за допомогою способів, відомих фахівцям у даній області техніки (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 і Kato (2007). Протокол коротко описаний далі. Наведені об'єми відповідають об'ємам, що додають в окремі ямки 96-ямкового планшета.

[00204] 1. Змішували 6,25 мкл GRON (80 мкМ) з 25 мкл протопластів, отриманих з меристематичної тканини трансгенного за BFP кореня *Arabidopsis*, при концентрації 5×10^6 клітин/мл у кожній ямці 96-ямкового планшета.

[00205] 2. Додавали 31,25 мкл 40 % розчину ПЕГ і перемішували протопласти.

[00206] 3. Оброблені клітини інкубували на льоді протягом 30 хв.

[00207] 4. У кожну ямку додавали 200 мкл розчину W5 і перемішували клітини.

[00208] 5. Планшети залишали для інкубації на льоді протягом 30 хв., дозволяючи протопластам осісти на дно кожної ямки.

[00209] 6. Видаляли 200 мкл середовища над осілими протопластами.

[00210] 7. Додавали 85 мкл культурального середовища (MSAP, див. Mathur та ін., 1995).

[00211] 8. Планшети інкубували при кімнатній температурі в темряві протягом 48 годин.

Кінцева концентрація GRON після додавання культурального середовища становила 8 мкМ.

[00212] 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 (BFP0 означає ненацілюючі GRON без зміни у порівнянні з BFP-мішенню; С являє собою схему кодуючої нитки та NC являє собою схему кодуючої нитки). Заміна одного нуклеотиду С на Т (кодуюча нитка) або спрямована мутація нуклеотиду G на A (некодуюча нитка) у центрі молекул BFP4. Зелена флуоресценція викликала введенням спрямованої мутації в ген BFP, що призводило до синтезу GFP. Результати показані на фігурі 1.

[00213] У наступній таблиці показана послідовність типового 101-меру й 201-меру BFP4/NC 5'-3PS/3'-3PS GRON, розробленого для перетворення гена синього флуоресцентного білка (BFP), щоб він давав зелену флуоресценцію (3PS означає 3 фосфотіоатних зв'язки на кожному з 5'- і 3'-кінців олігонуклеотиду).

[00214] Таблиця 1.

Назва GRON	Послідовність нуклеотидів GRON
BFP4/NC 101-мер	G*T*C*GTGCTGCTTCATGTGGCGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAAGGTGGTCACGAGGGTG GGCCAGGACGCGGCGAGCTTGCCGG*T*G*G
BFP0/NC 101-мер	G*T*C*GTGCTGCTTCATGTGGTCGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTGGTGAAGGTGGTCACGAGGGT GGCCAGGACGCGGCGAGCTTGCCGG*T*G*G
BFP4/C 101-мер	C*C*A*CCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGACGTCTCAGCCGC TACCCCGACCATGAAGCAGCAC*G*A*C
BFP0/C 101-мер	C*C*A*CCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCACCCACGGCGTGACGTCTCAGCCGC TACCCCGACCATGAAGCAGCAC*G*A*C
BFP4/NC 201-мер	A*A*G*ATGGTGCGCTCCTGGACGTAGCCTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTCTCATGTGGTCGG GGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAAGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCAGGGCAGCTTGCCG GTGGTGACAGTGAACCTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATGCCCTCG *C*C*C
BFP0/NC 201-мер	A*A*G*ATGGTGCGCTCCTGGACGTAGCCTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTCTCATGTGGTCGG GGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTGGTGAAGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCAGGGCAGCTTGCCG GTGGTGACAGTGAACCTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATGCCCTCG *C*C*C
BFP4/C 201-мер	G*G*G*CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCAACGGCAAGCTGCCGTGCC TGGCCCAACCTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGACGTGCTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCACGA CTTCTTCAAGTCCGCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT*C*T*T
BFP0/C 201-мер	G*G*G*CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCAACGGCAAGCTGCCGTGCC TGGCCCAACCTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGACGTGCTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCACGA CTTCTTCAAGTCCGCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT*C*T*T

* = PS-зв'язок (фосфотіоатний)

Приклад 2. Рівні перетворення при застосуванні GRON, мічених 5'-Cy3/3'-idC

[00215] Метою даної серії експериментів було порівняння ефективності GRON, мічених фосфотіоатом (PS) (що містять 3 PS-групи на кожному кінці GRON), з ефективністю GRON, мічених 5'-Cy3/3'-idC. GRON, мічені 5'-Cy3/3'-idC, містили 5'-Cy3 (флуорофор амідит) і 3'-idC (перевернена основа). Ефективність оцінювали за перетворенням синього флуоресцентного білка (BFP), після якого він давав зелену флуоресценцію.

[00216] У всіх трьох експериментах, проведених шляхом опосередкованої ПЕГ доставки GRON у протопласти або в окремих пробірках Falcon (позначених "пробірки"), або в 96-ямкових планшетах (позначених "96-ямковий планшет"), не спостерігали істотного розходження в ефективності перетворення BFP в GFP між різними хімічними складами GRON, що визначили за допомогою цитометрії (фіг. 1).

Приклад 3. Порівняння між 41-мірним GRON BFP4/NC 5'-3PS/3'-3PS і GRON фрагментів Оказакі.

[00217] Метою даної серії експериментів було порівняння ефективності перетворення за допомогою GRON, мічених фосфотіоатом (PS) (з 3 PS-групами на кожному кінці GRON), з ефективністю перетворення за допомогою "GRON фрагментів Оказакі" у присутності та відсутності представника сімейства блеоміцину - зеоцину™ (1 мг/мл), щоб викликати розриви ДНК. Схеми даних GRON зображені на фіг. 2. GRON доставляли у протопласти Arabidopsis з BFP шляхом обробки ПЕГ і визначали перетворення BFP в GFP через 24 год. після обробки за допомогою цитометрії. Зразки, оброблені зеоцином (1 мг/мл), інкубували з зеоцином протягом 90 хв на льоді перед обробкою ПЕГ.

[00218] Звичайна присутність зеоцину (1 мг/мл) підвищувала перетворення BFP в GFP, що визначали за допомогою цитометрії (таблиця 2). Як у присутності, так і відсутності зеоцину, NC Оказакі GRON, що містить одну 2'-ОМе групу на першій основі РНК на 5'-кінці GRON, більш ефективно перетворював BFP в GFP у порівнянні з NC Оказакі GRON, що містить одну 2'-ОМе групу на кожному з перших дев'яти 5'-кінцевих основ РНК (фіг. 2 і таблиця 2).

[00219] У всіх експериментах не спостерігали істотного розходження між 41-мірним BFP4/NC 5'-3PS/3'-3PS і 71-мірним BFP4/NC GRON фрагменту Оказакі, який містив одну 5' 2'-ОМе групу на першій 5'-основі РНК (позначений BFP4 71-мер (1) NC), у перетворенні BFP в GFP як у присутності, так і під час відсутності 1 мг/мл зеоцину, що визначили за допомогою цитометрії (фіг. 2 і таблиця 2). Важливо відзначити, що у присутності зеоцину (що також очікується для блеоміцину, флеоміцину, талісоміцину, пеплеоміцину й інших представників даного сімейства антибіотиків) таке перетворення не залежало від конкретної нитки (тобто досліджені конструкції GRON як із кодуючою (C), так і з не кодуючою (NC) ниткою в даних експериментах проявляли приблизно рівну активність).

[00220] Таблиця 2. Порівняння стандартної конструкції GRON з конструкціями GRON фрагментів Оказакі у присутності та відсутності глікопептидного антибіотика зеоцину.

Зеоцин (+)								
Експ. назва	BFP4 41-мер		BFP4 71-мер (0)		BFP4 71-мер (1)		BFP4 71-мер (9)	
	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C
АРТ043	0,13	0,0875	0,2275	0,2075	0,355	0,2275	0,2325	0,195
АРТ066	1,9	0,713	0,762	0,683	1,318	0,7103	0,769	0,883
Середнє	1,015	0,40025	0,49475	0,44525	0,8365	0,4689	0,50075	0,539
Ст. відхилення	1,251579	0,442295	0,377949	0,336229	0,680944	0,341391	0,379363	0,486489
Ст. помилка	0,885134	0,312797	0,26729	0,237786	0,481573	0,241436	0,268291	0,344052
Зеоцин (-)								
Експ. назва	BFP4 41-мер		BFP4 71-мер (0)		BFP4 71-мер (1)		BFP4 71-мер (9)	
	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C
АРТ043	н/в	н/в	0,1875	0,0175	0,21	0,025	0,1	0,0225
АРТ066	0,109	0,007	0,112	0,005	0,141	0,023	0,065	0,021
Середнє	0,109	0,007	0,14975	0,01125	0,1755	0,024	0,0825	0,02175
Ст. відхилення	н/д	н/д	0,053387	0,008839	0,04879	0,001414	0,024749	0,001061

Продовження таблиці 2

Ст. помилка	н/д	н/д	0,037756	0,006251	0,034505	0,001	0,017503	0,00075
BFP4 71-мер (0)		Перші 10 п. о. з 5'-кінця являють собою РНК і в GRON немає захисної групи						
NC	C							
BFP4 71-мер (1)		Перші 10 п. о. з 5'-кінця являють собою РНК і перша п. о. на 5'-кінці містить 2'-OMe						
NC	C							
BFP4 71-мер (9)		Перші 10 п. о. з 5'-кінця являють собою РНК і перші дев'ять п. о. на 5'-кінці містять 2'-OMe						
NC	C							

Приклад 4. Порівняння 41-мірного, 101-мірного та 201-мірного BFP4/NC 5'-3PS/3'-3PS GRON

- 5 [00221] Метою даної серії експериментів було порівняння ефективності перетворення (у присутності та відсутності зеоцину) за допомогою GRON, мічених фосфотіоатом (PS) (з 3 PS-групами на кожному кінці GRON), різної довжини: 41-мірного, 101-мірного та 201-мірного, - показаних у таблиці 1. Знову присутність зеоцину (1 мг/мл) підвищувала частоту перетворень BFP в GFP, що визначили за допомогою цитометрії (таблиця 3). Хід кривої у всіх трьох експериментах був лінійним при зростанні довжини NC GRON як у присутності, так і під час відсутності зеоцину. За винятком BFP-4/NC/101 і BFP-4/C/101 у присутності зеоцину, рівні перетворення були практично рівні, але менше, ніж в 41-мірного NC GRON. На відміну від всіх попередніх експериментів, у яких застосовували кодуючі та не кодуючі GRON BFP-4/41, у яких не кодуючий GRON завжди сильно перевершував кодуючий GRON. Така асиметрія частоти перетворення також поширювалася на BFP-4/201 GRON, застосовувані в даній серії експериментів.

15 [00222] Таблиця 3

Зеоцин (+)						
Експ. назва	BFP4 41-мер		BFP4 101-мер		BFP4 201-мер	
	NC	C	NC	C	NC	C
APT038	0,2425	0,1275	0,3025	0,2575	0,97	0,245
APT043	0,13	0,0875	0,185	0,2275	0,66	0,1875
APT047	0,3975	0,145	0,19	0,125	0,235	0,085
APT052	0,3275	н/в	0,17	0,21	0,585	0,225
APT052	н/в	н/в	0,3225	0,3175	0,5075	0,3125
APT058	1,4275	н/в	1,2	н/в	1,9	н/в
APT066	1,9	0,713	0,992	1,05	1,7	0,916
Середнє	0,7375	0,26825	0,480286	0,364583	0,936786	0,3285
Ст. відхилення	0,738280096	0,2974751	0,4289679	0,3416336	0,6309429	0,2974122
Ст. помилка	0,30146186	0,1487375	0,1621194	0,1394992	0,2384516	0,1214423
Зеоцин (-)						
Експ. назва	BFP4 41-мер		BFP4 101-мер		BFP4 201-мер	
	NC	C	NC	C	NC	C
APT038	0,05	0,01	0,1025	0,025	0,5725	0,025

АРТ066	0,109	0,007	0,214	0,047	0,566	0,035
Середнє	0,0795	0,0085	0,15825	0,036	0,56925	0,03
Ст. відхилення	0,0417193	0,0021213	0,0788424	0,0155563	0,0045962	0,0070711
Ст. помилка	0,029504456	0,0015002	0,0557584	0,0110017	0,0032505	0,0050008

[00222] Приклад 5. CRISPR, об'єднані з GRON, щоб поліпшити перетворення в рослинах.

5 [00223] Варто враховувати три компоненти розробки при зборці комплексу CRISPR: Cas9, пРНК (РНК-провідник) і цільова ділянка (протоспейсер в ендogenous цільовому гені).

[00224] Cas 9

10 - Тимчасова експресія гена Cas9 в *Streptococcus pyogenes*, кодон-оптимізованому для *Arabidopsis* або кукурудзи, що запускає 35S або убіквітином кукурудзи, відповідно. Оптимізовані гени синтезували в Genewiz або DNA 2.0. Примітка: варто впевнитися в тому, що не створюються криптичні інтрони.

- Термінатор RBCSE9 відповідає G1155.

- Один сигнал внутрішньоядерної локалізації (NLS) SV40 (PKKRKV) як C-кінцева вставка.

- Кістяк вектора буде таким самим, як і для всіх наших систем тимчасової експресії, - G1155.

[00225] пРНК

15 - Запропонували використовувати химерну трансактивуючу CRISPR РНК (тра-крРНК) - пре-крРНК, як в Le Cong та ін., 2013 й Jinek та ін., 2013. Варто відзначити, що LeCong та ін. показали, що нативний повнорозмірний комплекс тра-кр + пре-крРНК розщеплював набагато більш ефективно, ніж його химерна версія. Отже, як варіант, можна створити химеру, застосовуючи повнорозмірну (89 п.о.) тра-крРНК.

20 - Послідовність пРНК ((N)20 являє собою керівну послідовність). Заклучена в дужки послідовність включає повнорозмірну форму 89 п.о.

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG
(TTATGTTCTTGAAAAAAGTGAGTGGCACCGAGTCGGTGGTGCTTTTTT)

[00226] На фігурі нижче від Song та ін. показані нативний комплекс і химера:

B

Процесинг пре-крРНК + тра-крРНК

спейсер (30 п.о.)

пре-крРНК 5' - . . ACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGC... - 3'

• I I I I • I I I I I I

GUUCAACUAUUGCCUGATCGGAUAAAAUU CGAUACGA... - 5'

A I I I I GAA

тра-крРНК A I I I I

AAAGUGGCACCGA

• I I I I I I G

3' - UUUUCGUGGCU

Химерна РНК

керівна послідовність (20 п.о.)

5' - NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAG A

• I I I I • I I I I A

3' - GCCUGAUCCGGAUAAAAUU CGAUA

GAA

- pPHK буде експресуватися під контролем промотору AtU6 РНК-полімерази III в *Arabidopsis* (послідовність наведена нижче). У кукурудзі можна застосовувати промотор ZmU6 РНК-полімерази III. Такий вибір заснований на Wang та ін. 2008.

30 - Термінатор RBCSE9 відповідає G1155 або послідовності з T відповідно до Wang та ін. 2013
й однокомпонентного підходу, показаного нижче.

Послідовність промотору At U6 з Wang та ін.

[00227] Цільова ділянка

- Специфічність керівної послідовності визначається послідовністю цільової ділянки. Незалежно від вибору модельного організму це буде локус Y66H BFP. Послідовність PAM (NGG) поблизу Y66H являє собою єдиний сайт рестрикції в конструкції. Також, включення положення Y66H в 12 п.о. з 3'-сторони від керівної послідовності ("приманкова послідовність") буде означати, що після того, як була досягнута репарація, даний сайт знову не розрізеться.

Tc gtg acc acc ttc acc cac ggc

V T T F T Y

G

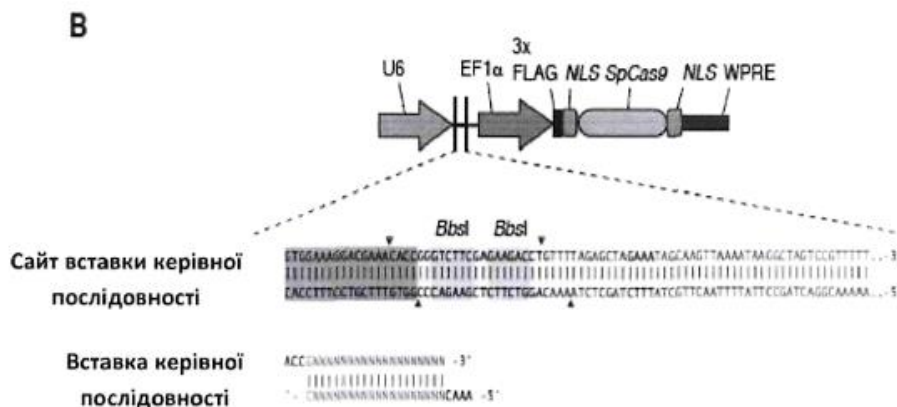
61 62 63 64 65 66 67

[00228] Для того, щоб дозволити одночасну доставку Cas9 і pРНК буде потрібен кістяк вектора, відмінний від G1155. Дану проблему можна обійти за допомогою однокомпонентного підходу.

[00229] Однокомпонентний підхід

[00230] Le Cong та ін. (2013) застосували спрощений підхід, здійснюючи експресію як pHK, так і Cas9 у вигляді єдиної тимчасової конструкції, запускаючу промотором U6 полімерази III, як описано нижче. Таким чином, для даної культури, можна націлитися на декілька генів шляхом простої заміни у вставленій керівній послідовності. Ми замінили промотор EF1 α на такий, підходящий для даної культури (pMAS для At, Ubi для Zm). Як термінатор ми застосували RBCSE9. В якості NLS, застосовуваного в рослинах, брали один C-кінець SV40, як описано вище.

[00231] Варто відзначити, що в наведеній нижче конструкції застосовували вкорочену пРНК, в яку не включена ділянка тра-крРНК. Автори показали, що в людей така конструкція менш ефективно запускала експресію Cas9, ніж повнорозмірна версія. Отже, запропонували використовувати в ній повнорозмірну пРНК. Примітно, що в наступній статті DiCarlo та ін. (2013), застосовуючи CRISPR у дріжджах, використовували повнорозмірну версію. Дану касету будуть клонувати в кістяк G1155.



[00232] Схематичне зображення вектора експресії химерної крПНК. Керівну послідовність можна вставити між двома сайтами Bbs, застосовуючи гібридизовані олігонуклеотиди. Вектор уже містить частину послідовності прямого повтору (сірий) і частину послідовності тра-крПНК (червоний). WPRE - посттранскрипційний регуляторний елемент вірусу гепатиту бабаків.

[00233] Аналіз in vivo

Тимчасовий варіант

- Один підхід для підтвердження впізнавання мішені та нуклеазної активності in planta буде складатися в імітації аналізу однострочкового відпалу YFP, який Zhang та ін. (2013) застосовували для TALEN. Спейсерна послідовність (цільова послідовність) і PAM повинні бути вбудовані в YFP або еквівалентний ген.

- Тимчасовий варіант

- Систему TALEN-BFP можна застосовувати як контроль.

- Тоді як описаний вище підхід буде являти собою засіб безперервного підтвердження функціонування даної системи CRISPR для даної спейсерної послідовності, доказом концепції активності CRISPR у рослинах буде застосування системи GFP.

- Тут можна трансформувати At конструкціями, застосовуваними для BFP \rightarrow GFP разом із G1155 і без GRON. Якщо рестрикції були досить ефективними, можна буде спостерігати

зниження експресії GFP. Для цього швидше за все буде потрібна оптимізація введення плазмиди.

- Після підтвердження активності, геномну мішень BFP можна буде виявити шляхом візуального та заснованого на послідовності читування.

5 [00234] Аналіз in vitro

- Для того, щоб швидко підтвердити активність системи CRISPR, можна застосовувати аналіз in vitro, описаний в Jinek та ін. 2012. У даному аналізі заздалегідь отриманий і очищений Cas9 *S.pyogenes* інкубували з синтезованої пРНК і плазмідною, що містить послідовність впізнавання. Успішне розщеплення аналізували шляхом електрофорезу в гелі для виявлення розрізаних плазмід. Докладний протокол.

10 [00235] Аналіз розщеплення плазмідної ДНК. Синтетичні або транскрибовані in vitro тра-крРНК і крРНК заздалегідь гібридизували перед реакцією шляхом нагрівання до 95 °C і повільного охолодження до кімнатної температури. Нативну або лінеаризовану шляхом розщеплення рестриктазами плазмідну ДНК (300 нг (~8 нм)) інкубували протягом 60 хв. при 37 °C з очищеним білком Cas9 (50-500 нМ) і дуплексом тра-крРНК:крРНК (50-500 нМ, 1:1) у буфері для розщеплення плазмиди Cas9 (20 мМ HEPES pH 7,5, 150 мМ KCl, 0,5 мМ DTT, 0,1 мМ ЕДТА) з додаванням або без 10 мМ MgCl₂. Реакції зупиняли додаванням 5X буфера для завантаження ДНК, що містить 250 мМ ЕДТА, розділяли шляхом електрофорезу в 0,8 % або 1 % агарозному гелі та візуалізували шляхом фарбування бромистим етидієм. Для аналізів розщеплення мутантів Cas9 реакції зупиняли додаванням 5X завантажувального буфера з ДСН (30 % гліцерин, 1,2 % ДСН, 250 мМ ЕДТА) перед завантаженням на агарозний гель.

[00236] Цільові ознаки в зернових культурах.

[00237] З огляду на гнучкість послідовності впізнавання CRISPR, не складно виявити потенційні протоспейсерні послідовності, визначені за послідовністю 3'-NGG PAM.

25 ZmEPSPS

[00238] В описаному нижче прикладі показана підходяща протоспейсерна послідовність (жовтий) і PAM (блакитний) для того, щоб одержати двонитковий розрив у каталітичному сайті ZmEPSPS, мутації в T97 і P101 якого, як відомо, викликають толерантність до гліфозату. Наступна опосередкована олігонуклеотидами репарація (ООР) отриманого розриву призведе до бажаних змін.

T A M R P L T V A A V

act gca atg cgg cca ttg aca gca gct gtt act gct gct gg

[00239] У таблиці нижче наведені протоспейсерні послідовності генів, що цікавлять, у зернових культурах, що цікавлять.

35

Культура	Ген	Послідовність протоспейсера
Канола	EPSPS 2-22 P101	ccgctgccgttactgctgca
	EPSPS-2-23 P101	cggctgcagttactgctgct
	EPSPS 2-25 P101	ccgctgcagttactgctgca
	EPSPS 2-28 P101	ccgctgcagttacagctgca
Льон	EPSPS P101	cagctgctgtaacagccgct
Картопля	EPSPS-2.1/2.2/2.3 P101	cagcagcagttgctgtagct
	EPSPS ген 1 P101	cagcagcagttacagtagct
Картопля	PPX R144	tgcgcctcgcttctgtgt
	PPX A220	attttacaggtgtttacgcc

[00240] Обмеження для даної конструкції полягає в тому, що часто важко знайти послідовність NGG всередині нуклеотиду, що складається з 12 п.о., зміненого за допомогою ООР. Це важливо, тому що в цьому випадку то успішна ООР означала б, що наступне розщеплення буде неможливо, тому що затравочна протоспейсерна послідовність була змінена. Jinek та ін. (2012) показали, що це негативно впливало на ефективність розщеплення.

40

[00241] Посилальні матеріали

[00242] LeCong та ін. 2013 Science: том 339, номер 6121, стор. 819-823.

[00243] Jinek та ін. 2012 Science. 337:816-21.

45

[00244] Wang та ін. 2008 RNA 14: 903-913.

[00245] Zhang та ін. 2013. Plant Physiol. 161: 20-27.

[00246] Для фахівця в даній області техніки повинно бути очевидно, що даний винахід гарно підходить для здійснення цілей і досягнення завдань та переваг, які згадані, а також властиві ним. Приклади, запропоновані в даній заявці, являють собою типові переважні варіанти реалізації, вони ілюстративні та не припускають обмеження обсягу даного винаходу.

5 [00247] Для фахівця в даній області техніки буде очевидно, що в даний винахід, описаний у даній заявці, можна внести різноманітні зміни та модифікації, не відхиляючись від обсягу та сутності даного винаходу.

10 [00248] Всі патенти та публікації, згадані в даному описі, вказують на рівні середніх фахівців в області техніки, до якої відноситься даний винахід. Всі патенти та публікації включені в дану заявку за допомогою посилання до того самого ступеня, як якби було зазначено, що кожна окрема публікація особливо й окремо включена за допомогою посилання.

15 [00249] Даний винахід, наочно описаний в даній заявці, можна відповідним чином здійснити під час відсутності будь-якого елемента або елементів, обмеження або обмежень, які конкретно не описані в даній заявці. Таким чином, наприклад, у кожному випадку в даній заявці будь-який з термінів "включаючий", "складаючий по суті з" і "складається з" можна замінити на будь-який з двох інших термінів. Терміни та формулювання, які були використані, застосовували для опису, а не обмеження, і не передбачається, що при застосуванні таких термінів і формулювань виключаються які-небудь еквіваленти показаних й описаних властивостей або їхніх частин, але
20 очевидно, що можливі різні модифікації в рамках заявленого обсягу даного винаходу. Таким чином, повинно бути очевидно, що хоча даний винахід був описаний конкретними переважними варіантами реалізації та необов'язковими властивостями, фахівці в даній області техніки можуть вдатися до модифікацій і варіацій ідей, описаних у даній заявці, і що такі модифікації та варіації вважають вхідними в обсяг даного винаходу, встановлений прикладеною формулою винаходу.

25 [00250] Інші варіанти реалізації описані в наведеній нижче формулі винаходу.

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-024-PCT
- <140> PCT/US2014/029566
- <141> 2014-03-14
- <150> 61/801,333
- <151> 2013-03-15
- <160> 38
- <170> PatentIn версія 3.5
- <210> 1
- <211> 99
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(4)
- <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (96)..(99)
- <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами
- <400> 1
- | | |
|---|----|
| gtcgtgctgc ttcattgtggc ggggtagcgg ctgaagcact gcacgccgta ggtgaagggtg | 60 |
| gtcacgaggg tgggccaggc acgggcagct tgccggtgg | 99 |
- <210> 2
- <211> 101
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний полінуклеотид

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(101)
 <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<400> 2
 gtcgtgctgc ttcattgtgt cgggtagcgc gctgaagcac tgcacgccgt gggtgaaggt 60
 gggtcacgagg gtgggccagg gcacgggcag ctgtccggtg g 101

<210> 3
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (98)..(101)
 <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<400> 3
 ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc tacggcgtgc 60
 agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga c 101

<210> 4
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

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

<220>

```

<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<220>
<221> misc_feature
<222> (98)..(101)
<223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<400> 4
ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc cacggcgtgc      60
agtgttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga c                               101

<210> 5
<211> 201
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<220>
<221> misc_feature
<222> (198)..(201)
<223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<400> 5
aagatggtgc gtcctggac gtagccttcg ggcatggcgg acttgaagaa gtcgtgctgc      60
ttcatgtggt cggggtagcg gctgaagcac tgcacgccgt aggtgaaggt ggtcacgagg      120
gtgggccagg gcacgggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggt cagcttgccg      180
taggtggcat cgccctcgcc c                               201

<210> 6
<211> 201
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

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

```

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (198)..(201)
 <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<400> 6
 aagatgggtgc gctcctggac gtagccttcg ggcatggcgg acttgaagaa gtcgtgctgc 60
 ttcatgtggt cggggtagcg gctgaagcac tgcacgccgt gggatgaaggt ggtcacgagg 120
 gtgggccagg gcacgggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggt cagcttgccg 180
 taggtggcat cgccctcgcc c 201

<210> 7
 <211> 201
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (198)..(201)
 <223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<400> 7
 gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa 60
 gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc tacggcgtgc agtgcttcag 120
 ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgcatgc ccgaaggcta 180
 cgtccaggag cgcaccatct t 201

<210> 8
 <211> 201
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний полінуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<220>

<221> misc_feature

<222> (198)..(201)

<223> Фосфотіоатний зв'язок між нуклеотидами

<400> 8

gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcacttgca ccaccggcaa 60

gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc cacggcgtgc agtgcttcag 120

ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta 180

cgtccaggag cgcaccatct t 201

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 9

Pro Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 10

<211> 110

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний полінуклеотид

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> а, с, т, g, невідомий або інший

```
<400> 10
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gtttagagc tagaaatagc aagttaaat aaggctagtc      60
cgttatgttc ttgaaaaaag tgagtggcac cgagtcggtg gtgctttttt      110
```

<210> 11
<211> 48
<212> РНК
<213> Штучна послідовність

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

```
<220>  
<221> modified_base  
<222> (3)..(32)  
<223> a, c, u, g, невідомий або інший
```

```
<400> 11
acnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnguuuuaga gcuaugcu 48
```

<210> 12
<211> 67
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

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

<223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

```
<400> 12
agcauagcaa guuaaaauaa ggctaguccg uuaucaacu gaaaaagugg caccgagucg      60
gugcuuu                                           67
```

<210> 13
<211> 62
<212> РНК
<213> Штучна послідовність

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

 $\langle 220 \rangle$

<221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> а, с, u, g, невідомий або інший

 <400> 13
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cg 62

 <210> 14
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 14
 tcgtgaccac cttcacccac ggc 23

 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 15
 Gly Val Thr Thr Phe Thr Tyr
 1 5

 <210> 16
 <211> 84
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 16
 gtggaaagga cgaaacaccg ggtcttcgag aagacctgtt ttagagctag aaatagcaag 60
 ttaaaataag gctagtccgt tttt 84

 <210> 17
 <211> 84
 <212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 17

aaaaacggac tagccttatt ttaacttgct atttctagct ctaaaacagg tcttctgaa 60

gacccggtgt ttcgtccttt ccac 84

<210> 18

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<220>

<221> modified_base

<222> (6)..(24)

<223> а, с, t, g, невідомий або інший

<400> 18

caccgnnnnn nnnnnnnnnn nnnn 24

<210> 19

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<220>

<221> modified_base

<222> (5)..(23)

<223> а, с, t, g, невідомий або інший

<400> 19

aaacnnnnn nnnnnnnnnn nnnn 24

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид

<400> 20

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Val Ala Ala Val
1 5 10

<210> 21

<211> 41

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 21

actgcaatgc ggccattgac agcagctgtt actgctgctg g

41

<210> 22

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 22

ccgctgccgt tactgctgca

20

<210> 23

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 23

cggctgcagt tactgctgct

20

<210> 24

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<400> 24 ccgctgcagt tactgctgca	20
<210> 25 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 25 ccgctgcagt tacagctgca	20
<210> 26 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 26 cagctgctgt aacagccgct	20
<210> 27 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 27 cagcagcagt tgctgtagct	20
<210> 28 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220> <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид	
<400> 28 cagcagcagt tacagtagct	20

<210> 29
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 29
 tgcgcctcgc tttgtcttgt 20

 <210> 30
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 30
 attttacagg tgtttacgcc 20

 <210> 31
 <211> 71
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

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

 <220>
 <223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (11)..(71)
 <223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

 <400> 31
 uucauguggu cgggtagcg gctgaagcac tgcacgccgt aggtgaaggt ggtcacgagg 60

 gtgggccagg g 71

<210> 32
 <211> 71
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
 <220>
 <223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<220>
 <221> modified_base
 <222> (11)..(71)
 <223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<400> 32
 uucauguggu cgggtagcg gctgaagcac tgcacgccgt gggtgaaggt ggtcacgagg 60
 gtgggccagg g 71

<210> 33
 <211> 71
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
 <220>
 <223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<220>
 <221> modified_base
 <222> (11)..(71)
 <223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<400> 33
 gcugcccgug ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc tacggcgtgc agtgcttcag 60

ccgctacccc g

71

<210> 34

<211> 71

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<220>

<223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-O-Ме-модифікований нуклеотид

<220>

<221> modified_base

<222> (11)..(71)

<223> 2'-O-Ме-модифікований нуклеотид

<400> 34

gcugcccgug ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc cacggcgtgc agtgcttcag

60

ccgctacccc g

71

<210> 35

<211> 71

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид

<220>

<223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(9)

<223> 2'-O-Ме-модифікований нуклеотид

<220>

<221> modified_base

<222> (11)..(71)

<223> 2'-O-Ме-модифікований нуклеотид

<400> 35
uucauguggu cggggtagcg gctgaagcac tgcacgccgt aggtgaaggt ggtcacgagg 60
gtgggccagg g 71

<210> 36
<211> 71
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
<220>
<223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(9)
<223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<220>
<221> modified_base
<222> (11)..(71)
<223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<400> 36
uucauguggu cggggtagcg gctgaagcac tgcacgccgt ggggaaggt ggtcacgagg 60
gtgggccagg g 71

<210> 37
<211> 71
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
<220>
<223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(9)
<223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

```

<220>
<221> modified_base
<222> (11)..(71)
<223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<400> 37
gcugcccgug ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc tacggcgtgc agtgcttcag      60
ccgctacccc g                                                                71

<210> 38
<211> 71
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

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

<220>
<223> Опис об'єднаної молекули ДНК/РНК: Синтетичний олігонуклеотид

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(9)
<223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<220>
<221> modified_base
<222> (11)..(71)
<223> 2'-O-Me-модифікований нуклеотид

<400> 38
gcugcccgug ccctggccca ccctcgtgac caccttcacc cacggcgtgc agtgcttcag      60
ccgctacccc g                                                                71

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб введення мутації, опосередкованої олігонуклеосоною для репарації генів (GRON), у цільову послідовність дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) у клітині рослини, який включає: доставку GRON у клітину, при цьому GRON має одну або більше і, переважно 2, 3, 4, 5 або більше, з наступних властивостей: довжина GRON становить більше, ніж 55 основ, GRON можливо містить два або більше сайтів
- 10 мутації для їхнього введення в цільову ДНК;
GRON містить один або більше нуклеотидів, позбавлених азотистої основи;
GRON містить один або більше нуклеотидів 8'-оксо-dA та/або 8'-оксо-dG;
GRON містить перевернену основу на 3'-кінці;
GRON містить один або більше 2'-О-метил-нуклеотидів на 5'- або 3'-кінці;
- 15 GRON містить один або більше 2'-О-метил-РНК-нуклеотидів на 5'-кінці;
GRON містить щонайменше два 2'-О-метил-РНК-нуклеотиди на 5'-кінці;
GRON містить інтеркалюючий барвник;
GRON містить 5'-кінцевий кеп;
- 20 GRON містить модифікацію кістяка, вибрану з групи, що складається з фосфотіоатної модифікації, метилфосфонатної модифікації, модифікації замкнутою нуклеїновою кислотою (ЗНК), модифікації О-(2-метоксіетилом) (МОЕ), модифікації ди-PS і модифікації пептидо-нуклеїновою кислотою (ПНК);
GRON містить одну або більше внутрішньоланцюгових поперечних зшивок;
GRON містить один або більше флуоресцентних барвників, ковалентно приєднаних до нього; і

GRON містить одну або більше основ, які підвищують енергію гібридизації; і доставку комплексу коротких паліндромних повторів, регулярно розташованих групами (CRISPR), у клітину рослини.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що зазначений спосіб додатково включає синтез GRON або його частини із застосуванням мультимерів нуклеотидів.

3. Спосіб за одним із пп. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що цільова послідовність дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) знаходиться всередині генома клітини рослини.

4. Спосіб за одним із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що клітина рослини належить до виду, вибраного з групи, що складається з наступних видів: канола, соняшник, тютюн, цукровий буряк, бавовник, маїс, пшениця, рис, люцерна, ячмінь, сорго, томат, 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, люпін, цвітна капуста, капуста кормова, кормові боби, тополя, сосна, евкаліпт, виноград, цитрусова рослина, тритикале, люцерна, жито, овес, дерен і кормові трави, льон, олійний рапс, гірчиця, огірок, в'юнок, бальзамін, перець, баклажан, чорнобривець, лотос, качанна капуста, ромен, гвоздика, тюльпан, ірис і лілія.

5. Спосіб за одним із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що клітина рослини є трансгенною.

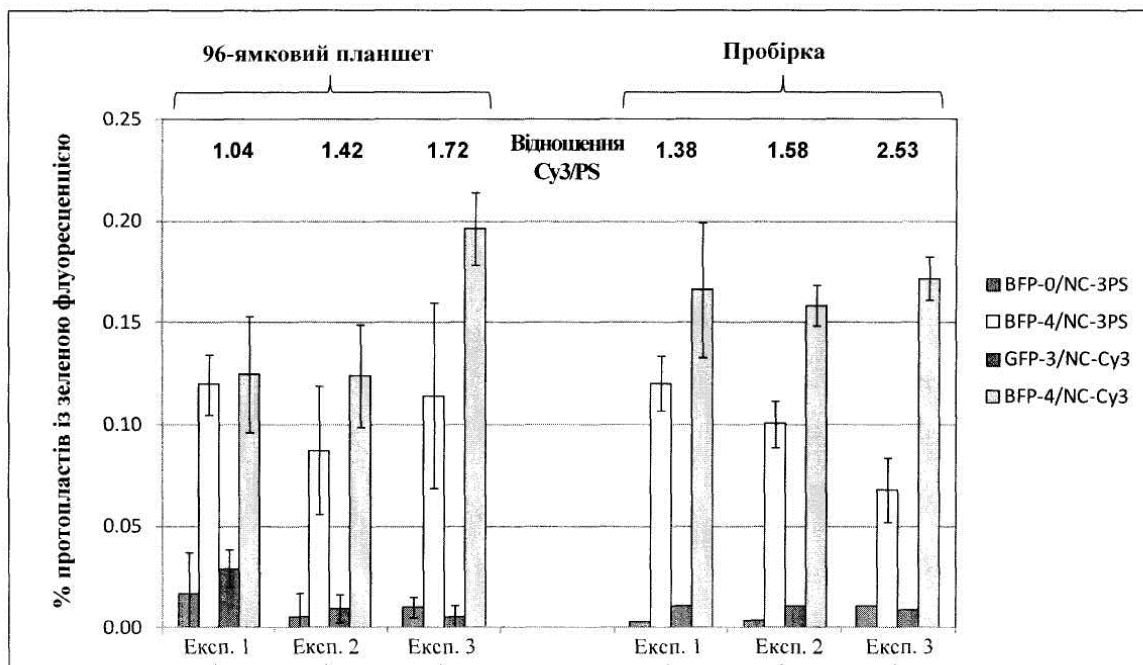
6. Спосіб за одним із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що цільова послідовність ДНК являє собою ендегенний ген зазначеної клітини рослини.

7. Спосіб за одним із пп. 1-6, який додатково включає відтворення рослини, що містить мутацію, введenu за допомогою GRON, з клітини рослини.

8. Спосіб за п. 7, який додатково включає збір насіння від рослини.

9. Застосування способу за одним із пп. 1-8, для одержання рослини, що містить геномну модифікацію, введenu за допомогою GRON, або насіння, що містить геномну модифікацію, введenu за допомогою GRON.

10. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що включає введення мутації в одну або більше клітин рослини.



Фіг. 1

A. GRON фрагментів Оказакі (BFP4, або 0/C, або NC/71/5'2'-O-Me (1))

BFP4/NC: U UCA UGU GGU CGG GGT AGC GGC TGA AGC ACT GCA CGC CGT AGG TGA AGG TGG TCA
CGA GGG TGG GCC AGG G (71-мер)

BFP0/NC: U UCA UGU GGU CGG GGT AGC GGC TGA AGC ACT GCA CGC CGT GGG TGA AGG TGG TCA CGA
GGG TGG GCC AGG G (71-мер)

BFP4/C: G CUG CCC GUG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC
CGC TAC CCC G (71-мер)

BFP0/C: G CUG CCC GUG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC ACC CAC GGC GTG CAG TGC TTC
AGC CGC TAC CCC G (71-мер)

Основи РНК

2'-О-Me група на всіх основах РНК, за виключенням основи, найбільш близької до першої основи ДНК GRON (основу РНК без 2'-О-Me групи виділено зеленим кольором)

B. GRON фрагментів Оказакі (BFP4, або 0/C, або NC/71/5'2'-O-Me (9))

BFP4/NC: U UCA UGU GGU CGG GGT AGC GGC TGA AGC ACT GCA CGC CGT AGG TGA AGG TGG TCA CGA
GGG TGG GCC AGG G (71-мер)

BFP0/NC: U UCA UGU GGU CGG GGT AGC GGC TGA AGC ACT GCA CGC CGT GGG TGA AGG TGG TCA CGA
GGG TGG GCC AGG G (71-мер)

BFP4/C: G CUG CCC GUG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC
CGC TAC CCC G (71-мер)

BFP0/C: G CUG CCC GUG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC ACC CAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC
CGC TAC CCC G (71-мер)

Основи РНК

2'-О-Me група на всіх основах РНК, за виключенням основи, найбільш близької до першої основи ДНК GRON (основу РНК без 2'-О-Me групи виділено зеленим кольором)

Фіг. 2

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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