



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월24일
(11) 등록번호 10-2304487
(24) 등록일자 2021년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8213 (2013.01)
A01H 5/00 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2015-7026632
(22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 2019년03월11일
(85) 번역문제출일자 2015년09월24일
(65) 공개번호 10-2015-0132202
(43) 공개일자 2015년11월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/029621
(87) 국제공개번호 WO 2014/144987
국제공개일자 2014년09월18일
(30) 우선권주장
61/801,320 2013년03월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Luciana Ferrara 등. Nucleic Acids Research.
Vol. 32, No. 17, 페이지 5239-5248 (2004.)*
Eunji Kim 등. Genome Research. Vol. 22, 페이지
1327-1333 (2012.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
시버스 유에스 엘엘씨
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 스위트 100 낸
시 릿지 드라이브 6455
시버스 유럽 비.브이.
네덜란드 4421 에이디 카펠레 고세스트랏츠베그
19
(72) 발명자
비덤, 피터, 알.
미국 캘리포니아주 92011 칼즈배드 태너저 드라이브
7701
고겔, 그레고리, 에프.더블유.
미국 캘리포니아주 92129 샌디에이고 바스모어 드
라이브 13737
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **올리고뉴클레오타이드 매개 유전자 보수를 사용한 표적화된 유전자 변형**

(57) 요약

본 발명은 식물 세포에서의 유전자의 변형을 위한 개선된 방법, 및 이로부터 유래한 식물 및 종자를 제공한다. 더 구체적으로, 본 발명은 유전자 보수 올리고뉴클레오타이드를 표적 세포 유전자 보수 기전의 성분의 이용가능성을 증대시키는 접근법과 조합함으로써 표적화된 유전자 돌연변이의 증가된 효율에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8201 (2013.01)

(72) 발명자

숍크, 크리스찬

미국 캘리포니아주 92009 칼즈배드 칼레 발라타
3222

사우어, 노엘, 조이

미국 캘리포니아주 92057 오션사이드 라 푸리스마
웨이 359

피어스, 제임스

미국 캘리포니아주 92037 라 올라 아베니다 피에스
타 5443

시가미, 로사, 이.

미국 캘리포니아주 92025 에스콘디도 베어 밸리 파
크웨이 408

모조루크, 제리

미국 캘리포니아주 92024 엔시니타스 유닛 비 웨스
트 글라우커스 스트리트 121

명세서

청구범위

청구항 1

식물 세포 계놈 내의 표적 데옥시리보핵산(DNA) 서열로 표적화 돌연변이를 도입하기 위한 방법으로서,

유전자 보수 올리고핵염기(gene repair oligonucleobase: GRON)를 상기 식물 세포에 전달하는 단계로서, 여기서 상기 GRON은 상기 식물 세포 계놈 내의 표적 DNA 서열에 혼성화하고 상기 표적화된 돌연변이를 암호화하는 표적 DNA 서열과 비교하여 하나 이상의 미스 매치된 염기쌍 (들)을 포함하는 핵산 서열인, 단계; 및

상기 식물 세포로의 GRON의 전달 전, 이와 동시 또는 전달 전 및 이와 동시 모두에 하나 이상의 세포 DNA 보수 과정을 증가시키는 조건 하에 상기 식물 세포를 배양하는 단계로서, 여기서 하나 이상의 세포 DNA 보수 과정을 증가시키는 조건은 단일 가닥 닉 또는 이중 DNA 가닥 파괴를 유도하는 부위-특이적 엔도뉴클레아제인 TALEN을 상기 식물 세포로 도입하는 것을 포함하는 것인, 단계;를 포함하며,

상기 식물 세포의 세포 DNA 보수 과정은 상기 식물 세포 계놈 내 표적 DNA 서열로 상기 돌연변이를 도입시키고,

상기 GRON은 단일 가닥이며 3' 차단 치환기 및 5' 차단 치환기를 포함하고, 각 차단 치환기는 포스포로티오에이트 또는 포스포아미데이트 뉴클레오티드 간 연결을 포함하며, 상기 3' 차단 치환기 및 5' 차단 치환기 부분이 아닌 GRON의 뉴클레오티드 간 연결은 변형되지 않은 포스포디에스테르 결합인, 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식물 세포는 카놀라, 해바라기, 옥수수(corn), 담배, 사탕무, 면, 메이즈(maize), 밀, 보리, 쌀, 알팔파, 보리, 수수, 토마토, 망고, 복숭아, 사과, 배, 딸기, 바나나, 멜론, 감자, 당근, 상추, 양파, 대두, 콩 종(soya spp), 사탕수수, 완두콩, 병아리콩, 경협종완두(field pea), 잠두(faba bean), 렌틸콩(lentils), 순무, 루타바가(rutabaga), 싹양배추, 루핀, 꽃양배추, 케일, 강남콩, 포플러, 소나무, 유칼립투스, 포도, 감귤류, 라이밀, 알팔파, 호밀, 귀리, 잔디(turf) 및 벼과 작물(forage grass), 아마, 유채, 겨자, 오이, 나팔꽃, 발삼, 후추, 가지, 메리골드, 연꽃(lotus), 양배추, 데이지, 카네이션, 튜립, 아이리스 및 백합으로 이루어진 군으로부터 선택된 식물 유래의 세포인 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 식물 세포는 돌연변이를 표적 DNA 서열로 도입한 후 비형질전환성인, 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 식물 세포는 돌연변이를 표적 DNA 서열로 도입한 후 비형질전환성인, 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 표적 DNA 서열은 상기 식물 세포의 내인성 유전자인 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 표적 DNA 서열은 상기 식물 세포의 내인성 유전자인 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 표적 DNA 서열은 상기 식물 세포의 내인성 유전자인 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 식물 세포로부터 상기 GRON에 의해 도입된 돌연변이를 갖는 식물을 재생하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 식물 세포로부터 상기 GRON에 의해 도입된 돌연변이를 갖는 식물을 재생하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 식물 세포로부터 상기 GRON에 의해 도입된 돌연변이를 갖는 식물을 재생하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 식물로부터 종자를 수집하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 식물로부터 종자를 수집하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 식물로부터 종자를 수집하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 2013년 3월 15일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/801,320호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] **기술분야**

[0003] 본 발명은 일반적으로 게놈 또는 다른 뉴클레오타이드 서열에서 특이적 위치에 대한 변형의 표적화의 효율을 개선하는 신규한 방법에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 본 명세서에 개시된 접근법에 의해 변형되거나, 돌연변이되거나, 마킹된 표적 DNA에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 변형된 세포, 조직 및 유기체에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] DNA 이중 가닥 파괴(DNA double-strand breaking: DSB)는 살아 있는 세포에서 상동성 재조합을 증대시키고, 조작된 엔도뉴클레아제의 사용을 통해 표적화된 게놈 편집에 대해 활용된다. 조작된 뉴클레아제의 중요한 성분은 게놈 DNA 이중 가닥 파괴에 대한 게놈의 표적 부위에 뉴클레아제를 지시할 수 있는 DNA 인식 도메인이다. 비상

동성 말단 연결(nonhomologous end-joining: NHEJ)로 인한 세포 DSB 보수는 표적 유전자의 돌연변이유발 결실/삽입을 발생시킨다. 대안적으로, 내인성 표적 좌위와 원하는 유전자 정보를 갖는 외인성으로 도입된 상동성 DNA 단편 사이의, 유전자 표적화라 불리는 과정인, 상동성 재조합을 자극할 수 있다.

[0005] 유전자 또는 게놈 편집을 포함하는 가장 유망한 방법은 아연 핑거 단백질의 DNA 결합 도메인 및 FokI 뉴클레아제 도메인(FokI nuclease domain: FN)으로 이루어진 하이브리드 효소의 유형인 맞춤형 설계된 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease: ZFN)이다. ZFN 기술은 아연 핑거(ZF) 단백질의 DNA 결합 도메인 및 엔도뉴클레아제 FokI의 비특이적 개열 도메인으로부터 유래한 하이브리드 단백질의 사용을 주로 포함한다. ZF는 예비 선택된 부위에서의 결합 이후 선택된 DNA 서열을 인식하도록 맞춤형 설계된 모듈로서 조립될 수 있고, DSB는 FokI의 개열 도메인의 작용에 의해 생성된다.

[0006] FokI 엔도뉴클레아제는 처음에 박테리아 플라보박테륨 오케아노코이트스(*Flavobacterium okeanoicoites*)로부터 단리된다. 이 IIS형 뉴클레아제는 N 말단 DNA 결합 도메인 및 C 말단 DNA 개열 도메인인 2개의 별개의 도메인으로 이루어진다. DNA 결합 도메인은 비회문식(non-palindromic) 서열 5'-GGATG-375'-CATCC-3'의 인식을 위해 작용하지만, 촉매 도메인은 인식 부위의 하류의 9개 및 13개의 뉴클레오타이드의 고정된 거리로 비특이적으로 이중 가닥 DNA를 개열시킨다. FokI는 용액 중의 불활성 단량체로서 존재하고, 몇몇 2가 금속의 존재 하에 이의 표적 DNA에 대한 결합 후에 활성 이합체가 된다. 기능적 복합체로서, 이중 가닥 DNA 분자에 대한 FokI 각각의 결합의 2개의 분자는 DNA 이중 가닥의 효과적인 개열을 위한 DNA 촉매 도메인을 통해 이합체화한다.

[0007] 유사한 방식으로, 다른 단백질/도메인이 특이적으로 DNA를 인식할 수 있는 경우 뉴클레아제는 또한 이 단백질/도메인을 사용함으로써 제조될 수 있다. TAL 이펙터는 잔토모나스(*Xanthomonas*)의 다양한 균주로 존재하는 박테리아 단백질의 큰 그룹에 속하고, III형 분비 시스템에 의해 숙주 세포로 전파되고, 그래서 III형 이펙터라 불린다. 숙주 세포에 있으면, 몇몇 TAL 이펙터는 숙주 유전자 상황에 따라 균주 독력(질환을 야기하는 능력) 또는 무독력(숙주 내성 반응을 촉발하는 능력)에 대해 이의 상응하는 숙주 표적 유전자를 전사적으로 활성화하는 것으로 밝혀졌다. 각각의 이펙터는 진핵생물 전사 활성제의 특성인 강력한 전사 활성화 도메인 및 기능적 핵 국제화 모티프를 함유한다. 그리고, 각각의 이펙터는 또한 34개의 아미노산의 다양한 수의 반복 단위로 이루어진 중앙 반복 구역을 함유하고, DNA 결합 도메인으로서의 반복 구역은 이 각각의 이펙터의 생물학적 특이성을 결정한다.

[0008] 문헌[Zhang et al., Plant Physiol. 161: 20-27, 2013(본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)]은 TAL 이펙터 유사 DNA 결합 도메인과 FokI의 촉매 도메인의 조합에 기초한 조작된 엔도뉴클레아제인 TALEN(transcriptional activator-like effector nuclease: 전사 활성제 유사 이펙터 뉴클레아제)의 용도를 개시한다. DNA 결합 도메인의 조작에 의해, 이 TALEN은 보고에 의하면 특이적 DNA 결합 도메인을 인식하도록 용이하게 설계될 수 있다. 모델 시스템으로서 담배 프로토플라스트를 사용하여, TALEN 인식 부위에 연결된 황색 형광 단백질 코딩 서열을 포함하는 단일 가닥 어닐링 폴리뉴클레오타이드 리포터를 사용하여 TALEN 활성을 평가한다. 이 리포터 시스템은 프로토플라스트에 전달되고, 개열-및-보수 사건은 기능적 YFP의 발현에 의해 측정될 수 있다.

발명의 내용

[0009] 제1 양상에서, 본 발명은 식물 세포에서 표적 데옥시리보핵산(DNA) 서열로 유전자 보수 올리고핵염기(gene repair oligonucleobase: GRON) 매개 돌연변이를 도입하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 특히 식물 세포로의 GRON의 전달 전에 및/또는 이와 동시에 하나 이상의 세포 DNA 보수 과정을 증가시키는 조건 하에 식물 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0010] 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 세포 DNA 보수 과정을 증가시키는 조건은 GRON으로의 또는 염기 삭제 보수를 표적화하는 식물 세포 DNA로의 하나 이상의 부위의 도입, GRON으로의 또는 비상동성 말단 결합을 표적화하는 식물 세포 DNA로의 하나 이상의 부위의 도입, GRON으로의 또는 마이크로상동성 매개 말단 결합을 표적화하는 식물 세포 DNA로의 하나 이상의 부위의 도입, GRON으로의 또는 상동성 재조합을 표적화하는 식물 세포 DNA로의 하나 이상의 부위의 도입, 및 GRON으로의 또는 푸싱 보수(pushing repair)를 표적화하는 식물 세포 DNA로의 하나 이상의 부위의 도입 중 하나 이상을 포함한다.

[0011] 소정의 실시형태에서, 표적 데옥시리보핵산(DNA) 서열은 식물 세포 게놈 내에 있다. 식물 세포는 비형질전환 또는 형질전환일 수 있고, 표적 DNA 서열은 식물 세포의 전이유전자 또는 내인성 유전자일 수 있다.

[0012] 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 세포 DNA 보수 과정을 증가시키는 조건은 식물 세포로의 GRON의 전달 전에

또는 이와 동시에 식물 세포로 단일 또는 이중 DNA 가닥 파괴를 유도하는 하나 이상의 화합물을 도입하는 것을 포함한다. 예시적인 화합물은 하기 본 명세서에 기재되어 있다.

- [0013] 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 일반적으로 식물에 적용 가능하다. 오직 예의 방식으로, 식물 종은 카놀라, 해바라기, 옥수수(corn), 담배, 사탕무, 면, 메이즈(maize), 밀, 보리, 쌀, 알팔파, 보리, 수수, 토마토, 망고, 복숭아, 사과, 배, 딸기, 바나나, 멜론, 감자, 당근, 상추, 양파, 대두, 콩 중(soya spp), 사탕수수, 완두콩, 병아리콩, 경협종완두(field pea), 잠두(faba bean), 렌틸콩(lentils), 순무, 루타바가(rutabaga), 싹양배추, 루핀, 꽃양배추, 케일, 강남콩, 포플러, 소나무, 유칼립투스, 포도, 감귤류, 라이밀, 알팔파, 호밀, 귀리, 잔디(turf) 및 벼과 작물(forage grass), 아마, 유채, 겨자, 오이, 나팔꽃, 발삼, 후추, 가지, 메리골드, 연꽃(lotus), 양배추, 데이지, 카네이션, 튜립, 아이리스 및 백합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 이들은 또한 박테리아, 진균 및 포유동물 세포 및 심지어 이들의 세포소기관(예를 들어, 미토콘드리아 및 엽록체)을 포함하는 모든 다른 생물학적 시스템에 전적으로 또는 부분적으로 적용될 수 있다.
- [0014] 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 식물 세포로부터 GRON에 의해 도입된 돌연변이를 갖는 식물을 재생하는 단계를 추가로 포함하고, 식물로부터의 종자를 수집하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0015] 관련 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 GRON에 의해 도입된 게놈 변형을 포함하는 식물 세포, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 GRON에 의해 도입된 게놈 변형을 포함하는 식물, 또는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 GRON에 의해 도입된 게놈 변형을 포함하는 종자에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명의 다른 실시형태는 하기 상세한 설명, 예시적인 실시형태 및 청구범위로부터 명확할 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 정의
- [0018] 본 발명은 하기 정의에 따라 이해되어야 한다.
- [0019] 올리고핵염기는 핵염기의 중합체이고, 이 중합체는 상보성 서열을 갖는 DNA에 대한 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍 짓기에 의해 하이브리드화할 수 있다.
- [0020] 핵염기는 퓨린, 피리미딘, 또는 이들의 유도체 또는 유사체인 염기를 포함한다. 핵염기는 펩타이드 핵염기, 펩타이드 핵산의 하위단위, 및 모폴린 핵염기뿐만 아니라, 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드를 포함한다. 뉴클레오사이드는 펜토스퓨라노실 모이어티, 예를 들어 임의로 치환된 리보사이드 또는 2'-데옥시리보사이드를 함유하는 핵염기이다. 뉴클레오사이드는 인을 함유하거나 함유하지 않을 수 있는 여러 연결 모이어티 중 하나에 의해 연결될 수 있다. 비치환 포스포다이에스터 연결에 의해 연결된 뉴클레오사이드는 뉴클레오타이드라 칭한다.
- [0021] 올리고핵염기 사슬은 중합체의 최종 핵염기인 단일 5' 말단 및 3' 말단을 갖는다. 특정한 올리고핵염기 사슬은 모든 유형의 핵염기를 함유할 수 있다. 올리고핵염기 화합물은 상보성이고 왓슨-크릭 염기 쌍 짓기에 의해 하이브리드화하는 하나 이상의 올리고핵염기 사슬을 포함하는 화합물이다. 핵염기는 데옥시리보형 또는 리보형 중 어느 하나이다. 리보형 핵염기는 핵염기(여기서, 2' 탄소는 하이드록실, 알킬옥시 또는 할로젠으로 치환된 메틸렌)을 함유하는 펜토스퓨라노실이다. 데옥시리보형 핵염기는 리보형 핵염기 이외의 핵염기이고, 펜토스퓨라노실 모이어티를 함유하지 않는 모든 핵염기를 포함한다.
- [0022] 올리고핵염기 가닥은 총체적으로 올리고핵염기 사슬 및 올리고핵염기 사슬의 분절 또는 구역 둘 다를 포함한다. 올리고핵염기 가닥은 3' 말단 및 5' 말단을 갖는다. 올리고핵염기 가닥이 사슬과 동연(coextensive)일 때, 이 가닥의 3' 말단 및 5' 말단은 또한 이 사슬의 3' 말단 및 5' 말단이다.
- [0023] 본 발명에 따르면, 식물 기관은 잎, 줄기, 뿌리, 엽아, 화아, 분열조직, 배아, 떡잎, 내배유, 꽃받침, 꽃잎, 암술, 심피, 수술, 꽃밥, 미세구, 꽃가루, 꽃가루 통(pollen tub), 밀씨, 씨방 및 과일, 또는 이로부터 취한 절편, 슬라이스 또는 디스크를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 식물 조직은 캘러스 조직, 기본 조직, 맥관 조직, 저장 조직, 분열 조직, 잎 조직, 새싹 조직, 뿌리 조직, 혹 조직, 식물 종양 조직 및 재생 조직을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 식물 세포는 세포벽을 갖는 단리된 세포, 다양한 크기의 이의 응집체 및 프로토플라스트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0024] 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는, 하기 기재된 바와 같은 최대 관련성에 대해 정렬될 때, 2개의 서열에서의 각각 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 서열이 동일할 때에 동일하다. 용어 "동일한" 또는 "동일성 백분율"은, 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 상황에서, 하기 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사

용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정할 때, 비교 윈도우에 걸쳐 최대 관련성에 대해 비교되고 정렬 될 때에, 동일하거나 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 특정한 백분율을 갖는, 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 의미한다. 보존적 치환이 다른 서열의 폴리펩타이드의 경우, 서열 동일성 백분율은 치환의 보존적 성질을 수정하도록 위로 조정될 수 있다. 이렇게 조정하는 수단은 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다. 통상적으로, 이것은 완전 불일치보다는 부분 불일치로서 보존적 치환을 점수 매겨서, 백분율 서열 동일성을 증가시키는 것을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 동일한 아미노산이 1의 점수를 받고, 비보존적 치환이 0의 점수를 받는 경우, 보존적 치환은 0과 1 사이의 점수를 받는다. 보존적 치환의 스코어링은 예를 들어 프로그램 PC/GENE(인텔리제네틱스(Intelligenetics)(미국 캘리포니아주 마운틴 뷰))에서 실행되는 바와 같은, 예를 들어 문헌[Meyers & Miller, Computer Applic. Biol. Sci. 4: 11-17 (1988)]의 알고리즘에 따라 계산된다.

[0025] 구절 "실질적으로 동일한" 및 "동일성 백분율"은, 2개의 핵산 또는 폴리펩타이드의 상황에서, 하기 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정할 때, 비교 윈도우에 걸쳐 최대 관련성에 대해 정렬될 때에, 적어도 50%, 유리하게는 60%, 바람직하게는 70%, 더 바람직하게는 80% 및 가장 바람직하게는 90% 내지 95%의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는 서열 또는 하위서열을 의미한다. 이 정의는 또한, 시험 서열이 기준 서열과 실질적인 동일성을 가질 때, 실질적인 서열 또는 하위서열 상보성을 갖는 시험 서열의 보체에 관한 것이다.

[0026] 당해 분야의 당업자는 2개의 폴리펩타이드가 면역학적으로 유사한 경우 2개의 폴리펩타이드가 또한 "실질적으로 동일"할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 전체 단백질 구조는 유사할 수 있지만, 2개의 폴리펩타이드의 1차 구조는 상당한 변동을 나타낸다. 따라서 2개의 폴리펩타이드가 실질적으로 동일한지를 측정하는 방법은 각각의 폴리펩타이드에 대한 단일클론 또는 다중클론 항체의 결합을 측정하는 단계를 포함한다. 제1 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체가 제1 폴리펩타이드에 대한 친화도의 적어도 1/3의 친화도로 제2 폴리펩타이드에 결합하는 경우, 2개의 폴리펩타이드는 실질적으로 동일하다. 서열 비교를 위해, 통상적으로 하나의 서열이 시험 서열이 비교되는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 이용할 때, 시험 서열 및 기준 서열은 컴퓨터로 입력되고, 하위서열 좌표가 필요한 경우 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수가 지정된다. 이후, 서열 비교 알고리즘은, 지정된 프로그램 매개변수에 기초하여, 기준 서열에 비해 시험 서열(들)에 대한 서열 동일성 백분율을 계산한다.

[0027] 예를 들어, 문헌[Smith & Waterman, 0.4dv. Appl. Math. 2:482 (I 98 I)]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 5 85:2444 (1988)]의 유사성 방법에 대한 조사에 의해, 이 알고리즘의 컴퓨터 실행(위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)(제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)(위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575))에 의한, GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA)에 의해, 정렬을 위한 소프트웨어, 예컨대 벡터 NTI 버전 #6(VECTOR NTI Version #6)(인포맥스, 인크.(InforMax, Inc.)(미국 메릴랜드주))에 의해, 문헌[ClustalW, Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position--specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680]에 기재된 절차에 의해 또는 육안 검사(일반적으로, 문헌[Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)] 참조)에 의해 비교를 위한 서열의 최적 정렬을 수행할 수 있다.

[0028] 서열 동일성 백분율 및 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리즘의 예는 각각 문헌[Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 and Altschul et al. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 33 89-3402]에 기재된 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 바이오기술 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 공중에게 이용 가능하다. 이 알고리즘은, 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 워드로 정렬될 때, 약간의 양의 값의 쓰레스홀드(threshold) 점수 T와 일치하거나 이를 만족시키는, 질의 서열에서의 길이(W)의 짧은 워드를 확인함으로써 높은 점수의 서열 쌍(HSP)을 확인하는 단계를 처음에 포함한다. T는 이웃 워드 점수 쓰레스홀드라 칭한다(상기 엘트슐(Altschul) 등의 문헌). 이 초기 이웃 워드 히트(hit)는 이를 함유하는 더 긴 HSP를 발견하기 위한 조사를 개시하기 위한 시드(seed)로서 작용한다. 이후, 워드 히트는, 누적 정렬 점수가 증가할 수 있는 한, 각각의 서열을 따라 방향 둘 다를 연장된다. 뉴클레오타이드 서열에 대해, 매개변수(M)(일치 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 0 초과) 및 N(불일치 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 0 미만)을 이용하여 누적 점수를 계산한다. 아

미노산 서열의 경우, 누적 점수를 계산하기 위해 스코어링 매트릭스를 이용한다. 누적 정렬 점수가 이의 최대 성취된 값으로부터 분량(X)만큼 떨어질 때 각각의 방향에서의 워드 히트의 연장은 중단되거나; 하나 이상의 음의 점수의 잔기 정렬의 축적으로 인해 누적 점수는 0 이하가 되거나; 서열 중 어느 하나의 말단이 도달된다. BLAST 알고리즘 매개변수(W, T 및 X)는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오타이드 서열의 경우)은 디폴트로서 11의 워드 길이(W), 10의 예측치(E), M=5, N=-4 및 가닥 둘 다의 비교를 이용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 워드 길이(W), 10의 예측치(E) 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스(문헌[Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)] 참조)를 이용한다. 서열 동일성 백분율을 계산하는 것 이외에, BLAST 알고리즘은 또한 2개의 서열 사이의 유사성의 통계 분석을 수행한다(예를 들어, 문헌[Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 일 측정치는 가장 작은 합계 확률(P(N))이고, 이것은 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 일치이 우연히 발생하는 확률의 표시를 제공한다. 예를 들어, 기준 핵산에 대한 시험 핵산의 비교 시 가장 작은 합계 확률이 약 0.1 미만, 더 바람직하게는 약 0.01 미만 및 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우, 핵산은 기준 서열과 유사하다고 생각된다.

[0029] 가닥 파괴

[0030] 올리고뉴클레오타이드로 또는 올리고뉴클레오타이드와 함께, 단일 가닥 또는 이중 가닥 파괴를 유도하는 화합물의 봉입은 비상동성 말단 연결(NHEJ), 마이크로상동성 매개 말단 연결(microhomology-mediated end joining: MMEJ) 및 상동성 재조합에 의해 보수된 병소를 생성한다. 예의 방식으로, 항생제의 블레오마이신 패밀리는, 아연 핑거 뉴클레아제, FokI(또는 제한 효소의 임의의 IIS형 클래스) 및 다른 뉴클레아제는, 보수 올리고뉴클레오타이드에 의한 전환에 대해 표적화된 부위의 근처에서 이중 가닥 파괴를 도입하기 위해, 보수 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단 또는 5' 말단에 공유 커플링될 수 있다. 항생제의 블레오마이신 패밀리는 블레오마이신, 제오신, 플레오마이신, 텔리소마이신, 캄레오마이신 등을 포함하는 DNA 개별 글라이코펩타이드이다.

[0031] 본 발명의 방법은 사용되는 DNA 변형 시약의 성질 또는 유형에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이러한 DNA 변형 시약은 DNA 가닥 파손을 발생시키는 라디칼을 방출한다. 대안적으로, 상기 시약은 DNA를 알킬화하여 복제 및 전사를 차단하는 부가물을 형성한다. 또 다른 대안에서, 상기 시약은 세포 효소가 가닥 파괴를 발생시키는 것을 저해하는 분자 또는 가교결합을 생성한다. TFO를 형성하기 위해 올리고뉴클레오타이드에 연결된 DNA 변형 시약의 예는 인돌로카바졸, 나프탈렌 다이이미드(NDI), 트랜스플라틴, 블레오마이신, 페난토다이하이드로다이옥신 및 사이클로프로파피롤로인들의 유사체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 특히, 인돌로카바졸은 토포아 이소머라제 I 저해제이다. 이 효소의 저해는 가닥 파괴 및 DNA 단백질 부가물 형성을 발생시킨다[Arimondo et al., Bioorganic and Medicinal Chem. 8, 777, 2000]. NDI는 구아닌 잔기의 부위에서 돌연변이를 발생시키는 구아닌을 산화시킬 수 있는 광산화제이다[Nunez, et al., Biochemistry, 39, 6190, 2000]. 트랜스플라틴은 TFO가 시약에 연결될 때 트리플렉스 표적에서 DNA와 반응하는 것으로 나타났다. 이 반응은 돌연변이유발일 수 있는 DNA 부가물을 형성시킨다[Columbier, et al., Nucleic Acids Research, 24: 4519, 1996]. 블레오마이신은 방사선 모방체로서 널리 사용되는 DNA 파괴제이다. 이것은 올리고뉴클레오타이드에 연결되고, 이 포맷에서 파괴제로서 활성인 것으로 나타났다[Sergeyev, Nucleic Acids Research 23, 4400, 1995; Kane, et al., Biochemistry, 34, 16715, 1995]. 사이클로프로파피롤로인들의 유사체는 TFO에 연결되고, 트리플렉스 표적 서열에서 DNA를 알킬화하는 것으로 나타났다. 이후, 알킬화 DNA는 돌연변이유발일 수 있는 화학 부가물을 함유할 것이다[Lukhtanov, et al., Nucleic Acids Research, 25, 5077, 1997]. 페난토다이하이드로다이옥신은 광활성화 시 라디칼 종을 방출하는 마스킹된 퀴논이다. 이것은 TFO에 연결되고, 광활성화 시 듀플렉스 DNA로 파괴를 도입하는 것으로 나타났다[Bendinskas et al., Bioconjugate Chem. 9, 555, 1998].

[0032] 표적화된 유전자 파괴를 생성하기 위한 하나의 전략은 부위 특이적 엔도뉴클레아제에 의해 생긴 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 파괴의 생성을 통한 것이다. 엔도뉴클레아제는 조류, 식물 및 인간을 포함하는 큰 동물 모델과 같은 더욱 전통적인 유전자 표적화 방법에 통상적으로 불용성(refractive)인 유기체에서 표적화된 유전자 파괴를 위해 가장 흔히 사용된다. 예를 들어, HIV 감염의 치료 및 예방을 위해 아연 핑거 뉴클레아제를 포함하는 인간 임상 실험이 현재 진행된다. 추가로, 엔도뉴클레아제 조작은 작물에서 바람직하지 않은 표현형을 생성하는 유전자를 파괴하는 시도에서 현재 사용되고 있다.

[0033] 메가뉴클레아제로도 공지된 귀소 엔도뉴클레아제는 큰(예를 들어, 14bp 초과)의 개별 부위로 인해 높은 정도의 특이성으로 게놈 DNA에서 이중 가닥 파괴를 생성시키는 서열 특이적 엔도뉴클레아제이다. 표적 부위에 대한 귀소 엔도뉴클레아제의 특이성은 유도된 DNA 파괴의 정확한 표적화를 허용하지만, 귀소 엔도뉴클레아제 개별 부위

는 희귀하고, 표적화된 유전자에서 천연 발생 개열 부위를 발견할 가능성은 작다.

- [0034] 조작된 귀소 엔도뉴클레아제는 기존의 귀소 엔도뉴클레아제의 특이성을 변형시킴으로써 생성된다. 일 접근법에서, 천연 발생 귀소 엔도뉴클레아제의 아미노산 서열로 변이가 도입되고, 이후 표적화된 결합 부위를 개열시키는 기능적 단백질을 선택하도록 생성된 조작된 귀소 엔도뉴클레아제가 스크리닝된다. 또 다른 접근법에서, 각각의 귀소 엔도뉴클레아제의 절반 부위로 이루어진 새로운 인식 부위를 생성하기 위해 2개의 상이한 귀소 엔도뉴클레아제의 인식 부위를 조합함으로써 키메라 귀소 엔도뉴클레아제를 조작한다.
- [0035] 인공 엔도뉴클레아제의 일 종류는 아연 핑거 엔도뉴클레아제이다. 아연 핑거 엔도뉴클레아제는 비특이적 개열 도메인, 통상적으로 FokI 엔도뉴클레아제의 도메인을 특이적 DNA 서열에 결합하도록 조작된 아연 핑거 단백질 도메인과 조합한다. 아연 핑거 엔도뉴클레아제의 모듈식 구조는 이것이 게놈에 부위 특이적 이중 가닥 파괴를 전달하기 위한 다양한 플랫폼이 되게 한다. 아연 핑거 엔도뉴클레아제의 하나의 제한은 표적 부위에 대한 낮은 특이성 또는 게놈에서의 다중 표적 부위의 존재가 표적이탈(off-target) 개열 사건을 발생시킬 수 있다는 것이다. FokI 엔도뉴클레아제가 이합체로서 개열되면서, 표적이탈 개열 사건을 방지하기 위한 일 전략은 인접한 9개의 염기 쌍 부위에서 결합하는 아연 핑거 도메인을 설계하는 것이다.
- [0036] TALEN은, 표적화 가능한 뉴클레아제로서, 특이적 DNA 부위로의 단일 가닥 및 이중 가닥 파괴를 유도하도록(이후 개열 부위에서 서열 변경을 생성하도록 활용될 수 있는 기전에 의해 보수됨) 사용된다.
- [0037] TALEN의 DNA 결합 구역을 조작하도록 사용된 기본적인 빌딩 블록은 잔토모나스 종 프로테오박테리아에 의해 코딩된 천연 발생 TALE로부터 유래한 매우 보존된 반복부 도메인이다. TALEN에 의한 DNA 결합은 매우 보존된 33개 내지 35개의 아미노산 반복부(반복부의 아미노 말단 및 카복시 말단 끝에서 추가의 TALE 유래 도메인에 의해 플랭킹됨)의 어레이에 의해 매개된다.
- [0038] 이 TALE 반복부는 DNA의 단일 염기에 특이적으로 결합하고, 이의 동일성은 반복부의 12번 및 13번 위치에서 통상적으로 발견되는 2개의 추가변 잔기에 의해 결정되고, 어레이에서의 반복부의 수는 원하는 표적 핵산의 길이에 상응하며, 반복부의 동일성은 표적 핵산 서열을 일치시키도록 선택된다. 표적 핵산은 표적 부위의 선택성을 최대화하기 위해 바람직하게는 15개 내지 20개의 염기 쌍이다. 표적 핵산의 개열은 통상적으로 TALEN 결합의 50개의 염기 쌍 내에 발생한다. TALEN 인식 부위 설계를 위한 컴퓨터 프로그램은 당해 분야에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Cermak et al., Nucleic Acids Res. 2011 July; 39(12): e82]을 참조한다.
- [0039] 원하는 표적 서열과 일치하도록 설계되면, TALENS는 재조합으로 발현되고 외인성 단백질로서 프로토플라스트로 도입되거나, 프로토플라스트 내의 플라스미드로부터 발현될 수 있다.
- [0040] GRON 구조 및 식물 세포로의 도입
- [0041] 레콤비노겐생성 올리고핵염기는 마이크로캐리어(유전자총 전달), 마이크로섬유(휘스커(whisker)), 전기천공, 직접 DNA 흡수 및 마이크로주사(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 당해 분야에서 통상 이용되는 임의의 방법을 이용하여 식물 세포로 도입될 수 있다. 레콤비노겐생성 올리고핵염기의 예시적인 예는 하기 기재되어 있다.
- [0042] 본 발명은 Kmiec I 및 Kmiec II 특허(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에서 기재된 입체구성 및 화학물질을 갖는 레콤비노겐생성 올리고핵염기에 의해 실행될 수 있다. Kmiec I은 표적 유전자에 대한 특이적 유전자 변경을 도입하는 방법을 교시한다. Kmiec I 및/또는 Kmiec II에서의 레콤비노겐생성 올리고핵염기는 2개의 상보성 가닥을 함유하고, 이들 중 하나는 다른 가닥의 DNA형 뉴클레오타이드에 염기 쌍 짓기가 된 RNA형 뉴클레오타이드("RNA 분절")의 적어도 하나의 분절을 함유한다.
- [0043] Kmiec II는 퓨린 및 피리미딘 염기 함유 비뉴클레오타이드가 뉴클레오타이드에 의해 치환될 수 있다고 교시한다. 미국 특허 제5,756,325호; 제5,871,984호; 제5,760,012호; 제5,888,983호; 제5,795,972호; 제5,780,296호; 제5,945,339호; 제6,004,804호; 및 제6,010,907호 및 국제 특허 제PCT/US00/23457호; 및 국제 특허 공보 WO 제98/49350호; WO 제99/07865호; WO 제99/58723호; WO 제99/58702호; WO 제99/40789호; US 제6,870,075호; 및 미국 공개 특허 출원 제20030084473호(각각 그 전문이 포함됨)는 본 발명에 사용될 수 있는 추가의 레콤비노겐생성 분자를 개시한다. 용어 "레콤비노겐생성 올리고핵염기"는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 분자를 지칭하도록 본 명세서에서 사용되고, 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드, Kmiec II에서 교시된 분자를 함유하는 비뉴클레오타이드, 단일 가닥 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 상기 기재된 특허 및 특허 공보에 교시된 다른 레콤비노겐생성 분자를 포함한다.
- [0044] 일 실시형태에서, 레콤비노겐생성 올리고핵염기는 2'-하이드록실을 플루오로, 클로로 또는 브로모 작용기로 대

체함으로써 또는 2'-O 상에 치환기를 위치시킴으로써 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드의 RNA형 뉴클레오타이드가 RNase 저항하게 만드는 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드이다. 적합한 치환기는 Kmiec II에 의해 교시된 치환기를 포함한다. 대안적인 치환기는 미국 특허 제5,334,711호(스프로우트(Sproat))가 교시한 치환기 및 특허 공보 EP 제629 387호 및 EP 제679 657호(전부, 마틴(Martin) 출원)(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)가 교시한 치환기를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 리보뉴클레오타이드의 2'-플루오로, 클로로 또는 브로모 유도체 또는 마틴 출원 또는 스프로우트에 기재된 치환기로 2'-OH가 치환된 리보뉴클레오타이드는 "2'-치환 리보뉴클레오타이드"라 칭한다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "RNA형 뉴클레오타이드"는, 비치환 포스포다이에스터 연결 또는 Kmiec I 또는 Kmiec II에 의해 교시된 임의의 비천연 연결에 의해 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드의 다른 뉴클레오타이드에 연결된, 2'-하이드록실 또는 2'-치환 뉴클레오타이드를 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "테옥시리보형 뉴클레오타이드"는, 비치환 포스포다이에스터 연결 또는 Kmiec I 또는 Kmiec II에 의해 교시된 임의의 비천연 연결에 의해 MDON의 다른 뉴클레오타이드에 연결될 수 있는, 2'-H를 뉴클레오타이드를 의미한다.

[0045] 본 발명의 일 실시형태에서, 레콤비노겐생성 올리고핵염기는 비치환 포스포다이에스터 결합에 의해서만 연결된 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드이다. 대안적인 실시형태에서, 연결은 치환 포스포다이에스터, 포스포다이에스터 유도체 및 Kmiec II에 의해 교시된 비인계 연결에 의한 연결이다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드에서의 각각의 RNA형 뉴클레오타이드는 2'-치환 뉴클레오타이드이다. 2'-치환 리보뉴클레오타이드의 특히 바람직한 실시형태는 2'-플루오로, 2'-메톡시, 2'-프로필옥시, 2'-알릴옥시, 2'-하이드록시에틸옥시, 2'-메톡시에틸옥시, 2'-플루오로프로필옥시 및 2'-트라이플루오로프로필옥시 치환된 리보뉴클레오타이드이다. 2'-치환 리보뉴클레오타이드의 더 바람직한 실시형태는 2'-플루오로, 2'-메톡시, 2'-메톡시에틸옥시 및 2'-알릴옥시 치환된 뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시형태에서, 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드는 비치환 포스포다이에스터 결합에 의해 연결된다.

[0046] 2'-치환 RNA형 뉴클레오타이드의 단일 유형만을 갖는 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드가 더 편리하게 합성되지만, 본 발명의 방법은 RNA형 뉴클레오타이드의 2개 이상의 유형을 갖는 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드에 의해 실행될 수 있다. RNA 분절의 기능은 2개의 RNA형 트라이뉴클레오타이드 사이의 테옥시뉴클레오타이드의 도입에 의해 발생한 중단에 의해 영향을 받지 않을 수 있다(따라서, 용어 RNA 분절은 이러한 "중단된 RNA 분절"을 포함한다). 비중단된 RNA 분절은 인접 RNA 분절이라 칭한다. 대안적인 실시형태에서, RNA 분절은 교대하는 RNase 저항 및 비치환 2'-OH 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 100개 미만의 뉴클레오타이드 및 더 바람직하게는 85개 미만의 뉴클레오타이드, 그러나 50개 초과 뉴클레오타이드를 갖는다. 제1 가닥 및 제2 가닥은 왓슨-크릭 염기 쌍 짓기가 된다. 일 실시형태에서, 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드의 가닥은 링커에 의해 공유 연결되어서(예컨대, 단일 가닥 핵사, 펜타 또는 테트라뉴클레오타이드), 제1 가닥 및 제2 가닥은 단일 3' 말단 및 단일 5' 말단을 갖는 단일 올리고뉴클레오타이드 사슬의 분절이다. 3' 말단 및 5' 말단은 "헤어핀 캡"의 부가에 의해 보호될 수 있고, 이에 의해 3' 말단 및 5' 말단 뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드에 왓슨-크릭 쌍 짓기가 된다. 제2 헤어핀 캡은 추가로 3' 말단 및 5' 말단으로부터 먼 제1 가닥과 제2 가닥 사이의 연결부에 위치할 수 있어서, 제1 가닥과 제2 가닥 사이의 왓슨-크릭 쌍 짓기가 안정화된다.

[0047] 제1 가닥 및 제2 가닥은 표적 ACCase 유전자의 2개의 단편과 상동성인, 즉 표적 유전자와 동일한 서열을 갖는 2개의 구역을 함유한다. 상동성 구역은 RNA 분절의 뉴클레오타이드를 함유하고, 연결 DNA 분절의 하나 이상의 DNA형 뉴클레오타이드를 함유할 수 있고, 개재 DNA 분절 내에 있지 않은 DNA형 뉴클레오타이드를 또한 함유할 수 있다. 상동성의 2개의 구역은 "이종성 구역"이라 칭하는 표적 유전자의 서열과 다른 서열을 갖는 구역에 의해 분리되고, 각각 이 구역에 인접한다. 이종성 구역은 1개, 2개 또는 3개의 불일치된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 불일치된 뉴클레오타이드는 인접할 수 있거나, 대안적으로 표적 유전자와 상동성인 1개 또는 2개의 뉴클레오타이드에 의해 분리될 수 있다. 대안적으로, 이종성 구역은 또한 1개, 2개, 3개 또는 5개 이하의 뉴클레오타이드의 삽입을 함유할 수 있다. 대안적으로, 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드의 서열은 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드로부터의 1개, 2개, 3개, 또는 5개 이하의 뉴클레오타이드의 결실만큼 표적 유전자의 서열과 다를 수 있다. 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드가 이종성 구역 내에 있지 않더라도, 이종성 구역의 길이 및 위치는, 이러한 경우에, 결실의 길이인 것으로 생각된다. 2개의 상동성 구역에 상보성인 표적 유전자의 단편 사이의 거리는 치환 또는 치환들이 의도될 때 동일하게 이종성 구역의 길이이다. 이종성 구역이 삽입을 함유하는 경우, 상동성 구역은 이로써 이의 상보성의 상동성 단편이 유전자에 있는 것보다 멀리 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드에서 분리되고, 이종성 구역이 결실을 코딩할 때 반대도 적용 가능하다.

- [0048] 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드의 RNA 분절은 각각 상동성 구역, 즉 표적 유전자의 단편과 서열이 동일한 구역의 일부이고, 분절은 함께 바람직하게는 적어도 13개의 RNA형 뉴클레오타이드 및 바람직하게는 16개 내지 25개의 RNA형 뉴클레오타이드 또는 훨씬 더 바람직하게는 18개 내지 22개의 RNA형 뉴클레오타이드 또는 가장 바람직하게는 20개의 뉴클레오타이드를 함유한다. 일 실시형태에서, 상동성 구역의 RNA 분절은 개재 DNA 분절에 의해 분리되고 이 분절에 인접, 즉 "이에 의해 연결된다". 일 실시형태에서, 이중성 구역의 각각의 뉴클레오타이드는 개재 DNA 분절의 뉴클레오타이드이다. 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드의 이중성 구역을 함유하는 개재 DNA 분절은 "뮤테이터 분절"이라 칭한다.
- [0049] 표적 유전자로 도입하고자 하는 변경은 이중성 구역에 의해 코딩된다. Agene으로 도입하고자 하는 변경은 원하는 아미노산에 대한 그 위치에서의 네이티브 아미노산을 변경시키는 유전자 서열의 하나 이상의 염기의 변경일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 레콤비노겐생성 올리고핵염기는 국제 특허 출원 제PCT/US00/23457호(이의 전문이 참조문헌으로 포함됨)에 개시된 단일 가닥 올리고데옥시뉴클레오타이드 돌연변이 벡터 또는 SSOMV이다. SSOMV의 서열은 미국 특허 제5,756,325호; 제5,871,984호; 제5,760,012호; 제5,888,983호; 제5,795,972호; 제5,780,296호; 제5,945,339호; 제6,004,804호; 및 제6,010,907호 및 국제 공보 WO 제98/49350호; WO 제99/07865호; WO 제99/58723호; WO 제99/58702호; WO 제99/40789호; US 제6,870,075호; 및 미국 공개 특허 출원 제20030084473호에 기재된 돌연변이 벡터와 동일한 원칙에 기초한다. SSOMV의 서열은 뮤테이터 구역이라 칭하는 원하는 유전자 변경을 함유하는 구역에 의해 분리된 표적 서열과 상동성인 2개의 구역을 함유한다. 뮤테이터 구역은 표적 서열에서 상동성 구역을 분리시키는 서열과 길이가 동일하지만, 서열이 상이한, 서열을 가질 수 있다. 이러한 뮤테이터 구역은 치환을 발생시킬 수 있다.
- [0051] SSOMV의 뉴클레오타이드는, 3' 말단 및/또는 5' 말단 뉴클레오타이드간 연결 또는 대안적으로 2개의 3' 말단 및/또는 5' 말단 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로티오에이트 또는 포스포아미데이트일 수 있다는 점을 제외하고는, 비변형 포스포다이에스터 결합에 의해 연결된 데옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 뉴클레오타이드간 연결은 SSOMV의 뉴클레오타이드 사이의 연결이고, 3' 말단 뉴클레오타이드 또는 5' 말단 뉴클레오타이드와 차단 치환기 사이의 연결을 포함하지 않고, 상기를 참조한다. 구체적인 실시형태에서, SSOMV의 길이는 21개 내지 55개의 데옥시뉴클레오타이드이고, 상동성 구역의 길이는 따라서 적어도 20개의 데옥시뉴클레오타이드의 전체 길이이고, 적어도 2개의 상동성 구역은 각각 적어도 8개의 데옥시뉴클레오타이드의 길이를 가져야 한다.
- [0052] SSOMV는 표적 유전자의 코딩 가닥 또는 비코딩 가닥에 상보성이라도 설계될 수 있다. 원하는 돌연변이가 단일 염기의 치환인 경우, 뮤테이터 뉴클레오타이드가 피리미딘인 것이 바람직하다. 원하는 기능적 결과를 성취하는 것과 일치하는 정도로, 상보성 가닥에서의 뮤테이터 뉴클레오타이드 및 표적화된 뉴클레오타이드 둘 다 피리미딘인 것이 바람직하다. 염기전이 돌연변이를 코딩하는 SSOMV가 특히 바람직하고, 즉 C 또는 T 뮤테이터 뉴클레오타이드는 상보성 가닥에서의 C 또는 T 뉴클레오타이드에 의해 각각 불일치된다.
- [0053] 올리고데옥시뉴클레오타이드 이외에, SSOMV는 링커를 통해 5' 말단 탄소에 부착된 5' 차단 치환기를 함유할 수 있다. 링커의 화학은 이의 길이 이외에 중요하지 않고, 이 길이는 바람직하게는 적어도 6개의 원자 길이어야 하고, 링커는 가요성이어야 한다. 다양한 비독성 치환기, 예컨대 바이오틴, 콜레스테롤 또는 다른 스테로이드 또는 비삽입성 양이온 형광성 염료를 사용할 수 있다. SSOMV를 만들기 위한 시약으로서 글렌 리서치(버지니아주 스텀링)(현재 지이 헬스케어(GE Healthcare))사제의 Cy3(상표명) 및 Cy5(상표명) 하에 판매되는 시약이 특히 바람직하고, 이것은 올리고뉴클레오타이드로의 편입 시 각각 3,3,3',3'-테트라메틸 N,N'-아이소프로필 치환된 인도모노카보사이아닌 및 인도다이카보사이아닌 염료를 생성하는 차단된 포스포아미다이트이다. Cy3이 가장 바람직하다. 인도카보사이아닌이 치환된 N-옥시알킬일 때, 이것은 5' 말단 포스페이트를 갖는 포스포다이에스터로서 올리고데옥시뉴클레오타이드의 5' 말단에 편리하게 연결될 수 있다. 염료와 올리고데옥시뉴클레오타이드 사이의 염료 링커의 화학은 중요하지 않고, 합성 편의를 위해 선택된다. 상업적으로 구입 가능한 Cy3 포스포아미다이트가 지시된 바대로 사용될 때, 생성된 5' 변형은 차단 치환기 및 링커로 이루어지고, 이것은 함께 N-하이드록시프로필, N'-포스파티딜프로필 3,3,3',3'-테트라메틸 인도모노카보사이아닌이다.
- [0054] 바람직한 실시형태에서, 인도카보사이아닌 염료는 인돌 고리의 3 및 3' 위치에서 4 치환된다. 이론에 제한됨이 없이, 이 치환은 염료가 삽입성 염료인 것을 막는다. 이 위치에서의 치환기의 정체성은 중요하지 않다. SSOMV는 부가하여 3' 차단 치환기를 가질 수 있다. 역시, 3' 차단 치환기의 화학은 중요하지 않다.
- [0055] 또 다른 바람직한 실시형태에서, 레콤비노겐생성 올리고뉴클레오타이드는, 적어도 25개의 데옥시뉴클레오타이드

및 65개 이하의 데옥시뉴클레오타이드를 갖는, 3' 말단 뉴클레오타이드, 5' 말단 뉴클레오타이드를 갖고, 적어도 8개의 데옥시뉴클레오타이드(이들 각각은 표적화된 염색체 유전자의 적어도 2개의 구역에 각각 동일하고, 이러한 구역은 함께 적어도 24개의 뉴클레오타이드 길이이고, 올리고데옥시뉴클레오타이드의 서열이 표적화된 염색체 유전자의 서열과 동일하지 않도록, 표적화된 염색체 유전자의 서열 또는 올리고데옥시뉴클레오타이드의 서열 또는 둘 다에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드에 의해 이러한 구역은 분리됨)의 적어도 2개의 구역을 각각 포함하는 서열을 갖는, 단일 가닥 올리고데옥시뉴클레오타이드이다. 미국 특허 제6,271,360호(본 명세서에 참조 문헌으로 포함됨)를 참조한다.

[0056] 마이크로캐리어 및 마이크로섬유

[0057] 발사체 침투에 의해 셀룰로스 세포벽을 갖는 식물 세포로 DNA의 큰 단편을 도입하기 위한 금속 마이크로캐리어(마이크로구)의 용도는 관련 분야(이하 유전자총 전달)의 당업자에게 널리 공지되어 있다. 미국 특허 제 4,945,050호; 제5,100,792호 및 제5,204,253호는 마이크로캐리어를 선택하기 위한 일반적인 기법 및 이를 투영하기 위한 장치를 기술한다. 미국 특허 제5,484,956호 및 제5,489,520호는 옥수수 캘러스 조직의 마이크로발사체 폭격을 이용한 비옥한 형질전환의 제법을 기술한다. 유전자총 기법은 미성숙 옥수수 배아를 형질전환하기 위해 또한 사용된다.

[0058] 본 발명의 방법에서 마이크로캐리어를 사용하기 위한 특정 조건은 국제 공보 WO 제99/07865호에 기재되어 있다. 예시적인 기법에서, 얼음 냉각 마이크로캐리어(60mg/ml), 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드(60mg/ml) 2.5M CaCl₂ 및 0.1M 스퍼미딘을 그 순서로 첨가하고; 혼합물을 예를 들어 10분 동안 와류시킴으로써 온화하게 진탕시키고, 실온에서 10분 동안 정치시키고, 이때 마이크로캐리어는 5용적의 에탄올 중에 용해되고 원심분리되고 100% 에탄올 중에 재현탁된다. 8-10µg/µl의 마이크로캐리어, 14-17µg/ml의 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드, 1.1-1.4M CaCl₂ 및 18-22mM 스퍼미딘의 부착 용액 중에 특정 농도로 우수한 결과가 얻어질 수 있다. 8µg/µl의 마이크로캐리어, 16.5µg/ml의 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드, 1.3M CaCl 및 21mM 스퍼미딘의 조건 하에 최적 결과가 관찰되었다.

[0059] 세포벽 및 세포막을 침투하는 마이크로섬유를 사용하여 본 발명을 실행하기 위해 레콤비노겐생성 올리고핵염기를 또한 식물 세포로 도입할 수 있다. 미국 특허 제5,302,523호(Coffee 등)는 블랙 멕시코 스위트(Black Mexican Sweet)의 현탁액 옥수수 배양물의 형질전환을 수월하게 하는 30×0.5µm 및 10×0.3µm 탄화규소 섬유 용도를 기술한다. 본 ACCase 돌연변이체를 제조하는 데 사용하기 위한 레콤비노겐생성 올리고핵염기를 전달하기 위해, 마이크로섬유를 사용한 식물 세포의 형질전환을 위해 DNA를 도입하기 위해 사용될 수 있는 임의의 기계적 기법을 이용할 수 있다. 레콤비노겐생성 올리고핵염기의 마이크로섬유 전달을 위한 예시적인 기법은 하기 기재되어 있다: 무균 마이크로섬유(2µg)를 약 10µg의 혼합 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 150µl의 식물 배양 배지 중에 현탁시킨다. 현탁액 배양물이 침전되게 하고, 동일 용적의 패킹된 세포 및 무균 섬유/뉴클레오타이드 현탁액을 10분 동안 와류시키고 플레이팅하였다. 선택적 배지를 즉시 또는 특정한 특징을 위해 적절한 바대로 약 120시간 이하의 지연으로 적용한다.

[0060] 전기천공

[0061] 대안적인 실시형태에서, 레콤비노겐생성 올리고핵염기를 식물 부분으로부터 유래한 프로토플라스트의 전기천공에 의해 당해 분야의 당업자에게 널리 공지된 기법에 따라 식물 세포로 전달할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Gallois et al, 1996, Methods in Molecular Biology 55:89-107, Humana Press, Totowa, N.J.; Kipp et al., 1999, Methods in Molecular Biology 133:213-221, Humana Press, Totowa, NJ]을 참조한다.

[0062] 레콤비노겐생성 올리고핵염기를 또한 전기천공에 의해 마이크로구로 도입할 수 있다. 사분염색체(tetrad)의 방출 시, 마이크로구는 단핵화하고, 벽이 얇다. 이것은 외막(exine) 형성 전에 발아공을 확대시키고 발생시킨다. 이 단계에서의 마이크로구는 식물 세포 이외의 외인성 DNA와 형질전환에 잠재적으로 더 적합하다. 또한, 마이크로구 발생은 식물로 재생될 수 있는 배발생 캘러스 또는 반수체 배아를 생성하도록 실험실내 변경될 수 있다 (Coumans et al., Plant Cell Rep. 7:618-621, 1989; Datta et al., Plant Sci. 67:83-88, 1990; Maheshwari et al., Am. J. Bot. 69:865-879, 1982; Schaeffer, Adv. In Cell Culture 7:161-182, 1989; Swanson et al., Plant Cell Rep. 6:94-97, 1987). 따라서, 형질전환된 마이크로구는 표준 방법에 의한 염색체 배가 시 반수체 식물 또는 이계능성반수체 비옥한 식물로 직접 재생될 수 있다. 발명의 명칭이 식물 유전자 변형을 위한 조성물 및 방법(Compositions and Methods for Plant Genetic Modification)인 동시 계류 중인 미국 출원 제 09/680,858호(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)를 또한 참조한다.

- [0063] 마이크로구 전기천공 방법은 문헌[Jardinaud et al., Plant Sci. 93:177-184, 1993, 및 Fennell and Hauptman, Plant Cell Reports 11:567-570, 1992]에 기재되어 있다. 식물 프로토플라스트로 MDON을 전기천공하는 방법은 마이크로구 전기천공에서 사용하도록 또한 채택될 수 있다.
- [0064] 휘스커 및 마이크로주사
- [0065] 훨씬 또 다른 대안적인 실시형태에서, 레콤비노겐생성 올리고핵염기는 식물 세포의 마이크로주사 또는 휘스커에 의해 식물 세포로 전달될 수 있다. 소위 휘스커 기법은 본질적으로 문헌[Frame et al., 1994, Plant J. 6:941-948]에 기재된 바대로 수행된다. 레콤비노겐생성 올리고핵염기는 휘스커에 첨가되고, 식물 세포를 형질전환시키기 위해 사용된다. 레콤비노겐생성 올리고핵염기는, 올리고뉴클레오타이드와 표적 서열 사이에 재조합이 촉매화 되도록, 식물 세포에서 레콤비나제 복합체를 형성할 수 있는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드와 동시향운처리될 수 있다.
- [0066] 식물의 선택
- [0067] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 식물은 나무 또는 관목으로 성장하는 임의의 목질 식물 종, 임의의 초본 종, 또는 식용 과일, 종자 또는 야채를 생성하는 임의의 종, 또는 색깔 있는 또는 방향족 꽃을 생성하는 임의의 종을 포함하는, 쌍떡잎식물, 외떡잎식물 또는 겉씨식물의 임의의 종일 수 있다. 예를 들어, 식물은, 이들이 구체적으로 이미 언급되지 않은 한, 카놀라, 해바라기, 곡식, 담배, 사탕무, 면, 옥수수, 밀, 보리, 쌀, 알팔파, 보리, 수수, 토마토, 망고, 복숭아, 사과, 배, 딸기, 바나나, 멜론, 감자, 당근, 상추, 양파, 대두, 콩 종, 사탕수수, 완두콩, 병아리콩, 경협종완두, 잠두, 렌틸콩, 순무, 루타바가, 싹양배추, 루핀, 꽃양배추, 케일, 강낭콩, 포플러, 소나무, 유칼립투스, 포도, 감귤류, 라이밀, 알팔파, 호밀, 귀리, 잔디 및 벼과 작물, 아마, 유채, 겨자, 오이, 나팔꽃, 발삼, 후추, 가지, 메리골드, 연꽃양배추, 데이지, 카네이션, 튜립, 아이리스, 백합 및 너트 생성 식물로 이루어진 군으로부터의 식물의 종으로부터 선택될 수 있다.
- [0068] 식물 및 식물 세포를 당해 분야에서 보통 공지된 방법을 이용하여, 예를 들어 제조제의 존재 하에 식물 또는 식물 세포를 성장시키고, 제조제의 부재 하의 성장 속도와 비교하여 성장 속도를 측정함으로써 제조제에 대한 내성 또는 관용성에 대해 시험할 수 있다.
- [0069] 본 명세서에 사용되는 바대로, 식물, 식물 기관, 식물 조직 또는 식물 세포의 실질적으로 정상인 성장은 야생형 AHAS 단백질을 발현하는 상응하는 식물, 식물 기관, 식물 조직 또는 식물 세포에서의 성장 속도 또는 세포 분열의 속도의 적어도 35%, 적어도 50%, 적어도 60%, 또는 적어도 75%인 식물, 식물 기관, 식물 조직, 또는 식물 세포의 성장 속도 또는 세포 분열의 속도로 정의된다.
- [0070] 본 명세서에 사용되는 바대로, 식물, 식물 기관, 식물 조직 또는 식물 세포의 실질적으로 정상인 발육은 야생형 단백질을 발현하는 상응하는 식물, 식물 기관, 식물 조직 또는 식물 세포에서 발생하는 것과 실질적으로 동일한 식물, 식물 기관, 식물 조직 또는 식물 세포에서의 하나 이상의 발육 사건의 발생으로 정의된다.
- [0071] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 식물 기관은 잎, 줄기, 뿌리, 엽아, 화아, 분열조직, 배아, 떡잎, 내배유, 꽃받침, 꽃잎, 암술, 심피, 수술, 꽃밥, 미세구, 꽃가루, 꽃가루 통(pollen tub), 밑씨, 씨방 및 과일, 또는 이로부터 취한 절편, 슬라이스 또는 디스크를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 식물 조직은 캘러스 조직, 기본 조직, 맥관 조직, 저장 조직, 분열 조직, 잎 조직, 새싹 조직, 뿌리 조직, 혹 조직, 식물 종양 조직 및 재생 조직을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 식물 세포는 세포벽을 갖는 단리된 세포, 다양한 크기의 이의 응집체 및 프로토플라스트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0072] 식물은, 관련 제조제로 처리될 때, 관련 제조제에 실질적으로 "관용성"이고, 유사하게 처리된 비관용성 유사 식물에 의해 제공된 것과 비교할 때, 오른쪽으로 이동한 용량/반응 곡선을 제공한다. 이러한 용량/반응 곡선은 "용량"은 x축에 작도되고, "사멸 백분율", "제조 효과" 등은 y축에 작도된다. 관용성 식물은 소정의 제조 효과를 생성하기 위해 비관용성 유사 식물보다 더 많은 제조제를 요할 것이다. 제조제에 실질적으로 "내성"인 식물은, 밭에서 잡초를 죽이려고 하는 농민이 통상적으로 이용하는 농도 및 속도로 제조제에 처리될 때, 있다면, 피사성, 용해성, 백화 또는 다른 병소를 나타낸다. 제조제에 내성인 식물은 또한 제조제에 관용성이다.
- [0073] 식물의 생성
- [0074] 식물 종의 다양한 조직의 조직 배양 및 이로부터의 식물의 재생은 공지되어 있다. 예를 들어, 조직 배양에 의한 카놀라 품종의 증식은 임의의 하기에 기재되어 있지만, 임의의 하기로 제한되지는 않는다: Chuong et al., "A Simple Culture Method for *Brassica* hypocotyls Protoplasts," Plant Cell Reports 4:4-6, 1985; Barsby, T.

L., et al., "A Rapid and Efficient Alternative Procedure for the Regeneration of Plants from Hypocotyl Protoplasts of *Brassica napus*," Plant Cell Reports (Spring, 1996); Kartha, K., et al., "In vitro Plant Formation from Stem Explants of Rape," Physiol. Plant, 31:217-220, 1974; Narasimhulu, S., et al., "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, Vol. 6, Chapter 17, p. 159, 1990.

[0075] 품종의 추가의 재생은 조직 배양 및 재생에 의해 일어날 수 있다. 대두의 다양한 조직의 조직 배양 및 이로부터의 식물의 재생은 널리 공지되어 있고, 널리 공개되어 있다. 예를 들어, 문헌[Komatsuda, T. et al., "Genotype X Sucrose Interactions for Somatic Embryogenesis in Soybeans," Crop Sci. 31:333-337, 1991; Stephens, P. A., et al., "Agronomic Evaluation of Tissue-Culture-Derived Soybean Plants," Theor. Appl. Genet. 82:633-635, 1991; Komatsuda, T. et al., "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. et al., "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. et al., "Plant Regeneration from Leaf and Hypocotyl Explants of *Glycine wightii* (W. and A.) VERDC. var. *longicauda*," Japan J. Breed. 42:1-5, 1992; 및 Shetty, K., et al., "Stimulation of *In Vitro* Shoot Organogenesis in *Glycine max* (Merrill.) by Allantoin and Amides," Plant Science 81:245-251, 1992]을 참조할 수 있다. 1991년 6월 18일에 콜린스(Collins) 등에게 등록된 미국 특허 제5,024,944호 및 1991년 4월 16일에 란치(Ranch) 등에게 등록된 미국 특허 제5,008,200호의 개시내용은 본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함된다.

[0076] 하기 실시예는 본 발명의 실행을 예시하지만, 이의 범위를 제한하도록 해석되어서는 안 된다.

[0077] **실시예 1:** 표적화된 염기 변화 근처에 개입하는 전사 활성제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 쌍과 조합된, 유전자 보수 올리고뉴클레오타이드(GRON)를 통한 표적화된 단일 뉴클레오타이드 돌연변이의 도입에 의한, 형질전환 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 세포에서의 녹색 형광 단백질(GFP)로의 청색 형광성 단백질(BFP) 유전자의 극적으로 개선된 전환.

[0078] 청색 형광성 단백질 유전자의 다중 카피를 갖는 아라비도시스 세포주를 당해 분야의 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 생성하였다(예를 들어, 문헌[Clough and Brent, 1998] 참조). 뿌리 유래 분열 조직 배양을 프로토플라스트 단리 및 배양에 사용되는 이 세포주에 의해 확립하였다(예를 들어, 문헌[Mathur et al., 1995] 참조). 프로토플라스트로의 GRON 전달을 프로토플라스트로의 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 매개된 GRON 흡수를 통해 성취하였다. 문헌[Fujiwara and Kato(2007)]에 기재된 것과 유사한 96웰 포맷을 이용하는 방법을 이용하였다. 하기에 프로토콜이 간단히 기재되어 있다. 제공된 용적은 96웰 접시의 개별적인 웰에 적용된 것이다.

[0079] 1. 96웰 플레이트의 각각의 웰에서 5×10^6 개 세포/ml로 $6.25 \mu\text{l}$ 의 GRON/TALEN 혼합물($80 \mu\text{M}$ MBFP4 코딩/41합체 GRON)을 $25 \mu\text{l}$ 의 아라비도시스 BFP 형질전환 뿌리 분열 조직 유래 프로토플라스트와 혼합한다.

[0080] 2. $31.25 \mu\text{l}$ 의 40% PEG 용액을 첨가하고, 프로토플라스트를 혼합한다.

[0081] 3. 처리된 세포를 얼음에서 30분 동안 항온처리한다.

[0082] 4. 각각의 웰에 $200 \mu\text{l}$ 의 W5 용액을 첨가하고, 세포를 혼합한다.

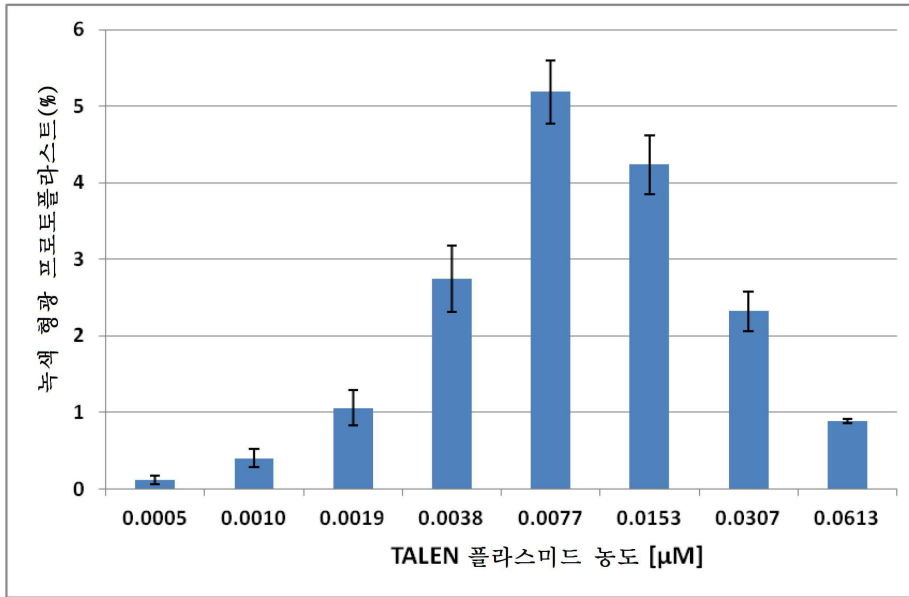
[0083] 5. 플레이트를 얼음에서 30분 동안 항온처리하여 프로토플라스트가 각각의 웰의 바닥에 침강하게 한다.

[0084] 6. 침강된 프로토플라스트 위의 $200 \mu\text{l}$ 의 배지를 제거한다.

[0085] 7. $85 \mu\text{l}$ 의 배양 배지(MSAP, 문헌[Mathur et al., 1995] 참조)를 첨가한다.

[0086] 8. 플레이트를 암소에서 실온에서 48시간 동안 항온처리한다. 배양 배지의 첨가 후 GRON의 최종 농도는 $8 \mu\text{M}$ 이다.

[0087] 이 프로토콜을 이용하여, 상이한 농도에서의 TALEN 플라스미드를 GRON과 함께 도입하였다. GRON 전달 48시간 후, 샘플을 녹색 및 황색 형광이 대조군 프로토플라스트와 다른 프로토플라스트를 검출하기 위해 유세포 분석법에 의해 비교하였다. 녹색 형광은 BFP 유전자에서의 표적화된 돌연변이의 도입(GFP를 합성시킴)에 의해 생성되었다. 결과가 도 1에 도시되어 있다.



[0088]

[0089] **도 1.** 뿌리 분열 조직 유래 프로토플라스트를 BFP 유전자에서 돌연변이를 표적화하는 GRON과 함께 다양한 농도의 TALEN 플라스미드로 처리하여, GFP 유전자로의 전환을 발생시켰다. GFP 발현을 GRON/TALEN 전달 48시간 후 유세포 계수법에 의해 측정하였다.

[0090] 모든 하기 실시예 2 내지 실시예 11의 경우, 하기 범례가 적용된다:

[0091] GRON

[0092] BFP → GFP 표적화 설계.

[0093] BFP → GFP H66Y CAC → TAC.

[0094] BFP4/C/41/5'Cy3/3'idC

[0095] VCCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCH

[0096] BFP4/NC/41/5'Cy3/3'idC

[0097] VGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAAGGTGGTCACGAGGGH

[0098] BFP 비표적화 대조군 설계.

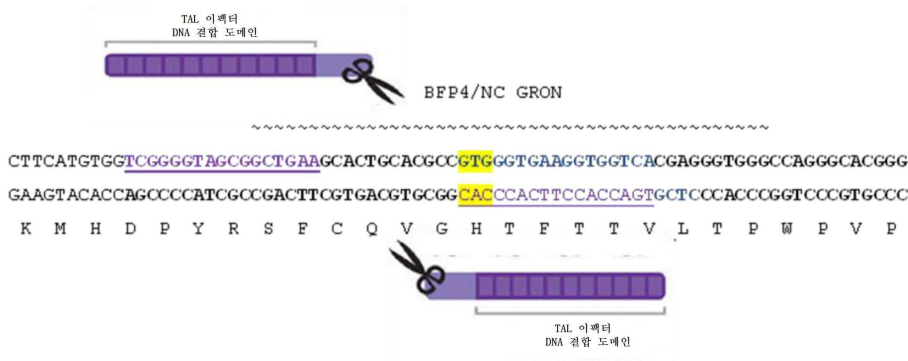
[0099] BFP H66 - CAC

[0100] BFP0/C/41/5'3PS/3'3PS

[0101] VCCCTCGTGACCACCTTCACCCACGGCGTGCAGTGCTTCAGCH

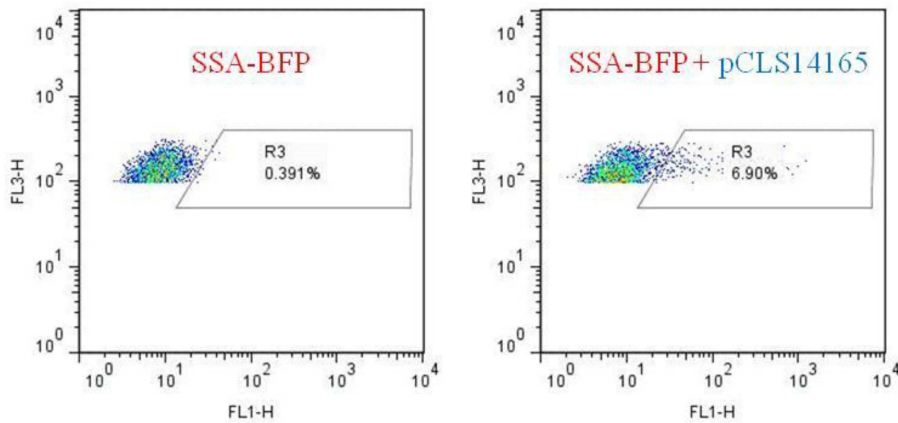
[0102] VGCTGAAGCACTGCACGCCGTGGGTGAAGGTGGTCACGAGGGH

[0103] TALEN:



[0104]

[0105] pCLS14165는 단일 플라스미드 상에 (장(Zhang) 등의 문헌(2013)에 따라 설계된) TAL 암 둘 다를 갖고, 각각의 암은 밑줄 친 서열에 결합하고, FokI 단량체에 연결된다. 이 조합은 장 등의 문헌(2013)과 동일하게 수행된 단일 가닥 어닐링 검정(single strand annealing assay: SSA)에서 하기 도시된 바대로 이중 가닥 파괴(DSB)를 생성한다.



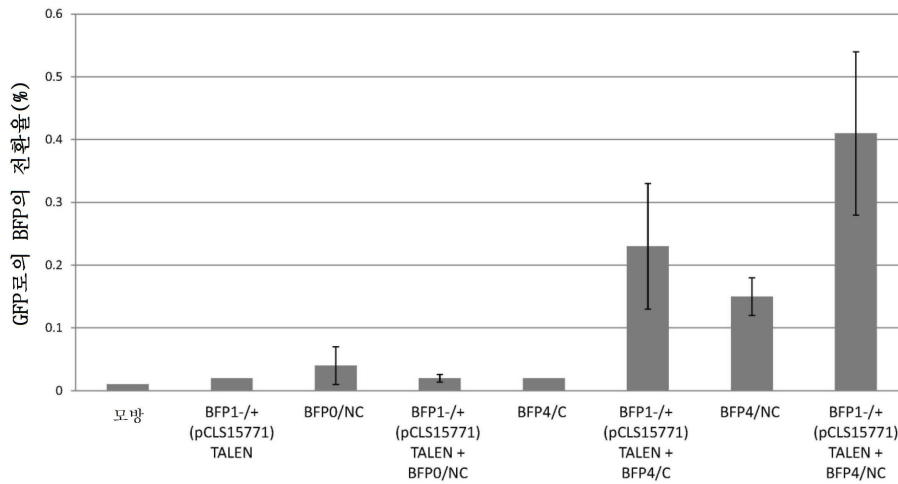
[0106]

[0107] pCLS15771은 왼쪽 암에 대해 FokI 도메인에서 돌연변이(D450A)를 갖는 니카제(nickase)이다. 이 작제물에서의 오른쪽 암은 pCLS14165에 따른다.

[0108] GRON 및 TALEN을 하기한 바대로 시험하였다. 비표적화 GRON(BFPO/C 또는 BFPO/NC) 및 TALEN 단독으로 이루어진 대조군 처리, 및 GRON 또는 TALEN 플라스미드가 결합된 40% PEG 용액을 갖는 모방 처리는 상당한 전환 활성을 갖지 않았다.

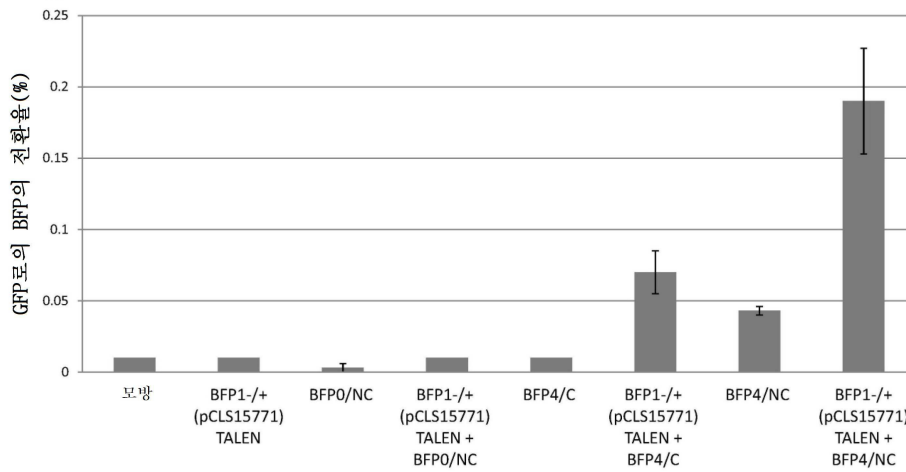
[0109] 이 시스템에서, BFP4/NC GRON 설계 단독은 BFP4/C GRON 설계 단독보다 우수하다. 이것과 DSB TALEN(pCLS14165)의 조합은 BFP4/C GRON에 의해 최고의 활성 및 배수 개선(많은 경우에 2 차수 초과 규모) 둘 다를 개선한다. 상당한 개선이 GRON을 니카제 TALEN 쌍과 조합함으로써 또한 관찰되고, 몇몇 유전자/좌위/대립유전자에서 돌연변이가 동시에 표적화될 때 부차적인 손상을 최소화함으로써 가장 유리한 것으로 예상된다.

[0110] 실시예 2: GRON + TALEN 니카제.



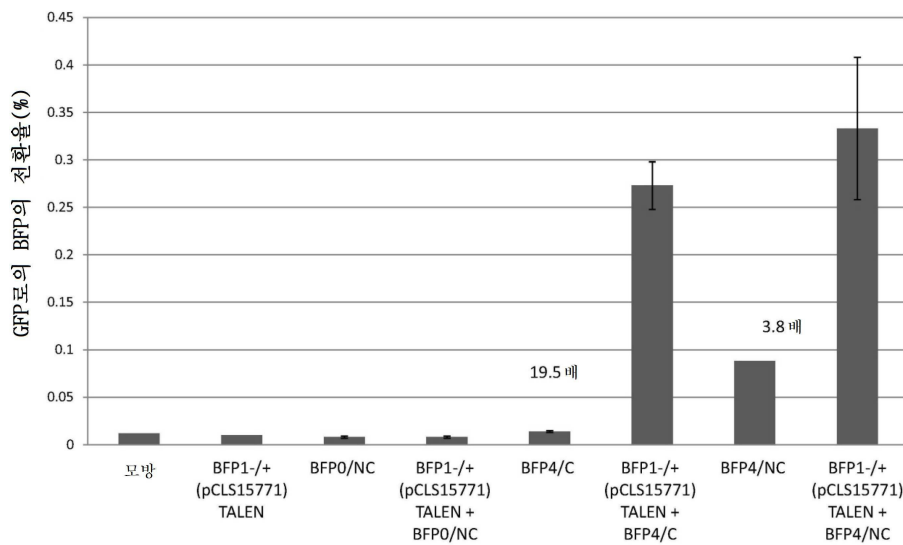
[0111]

[0112] 실시예 3: GRON + TALEN 니카제.



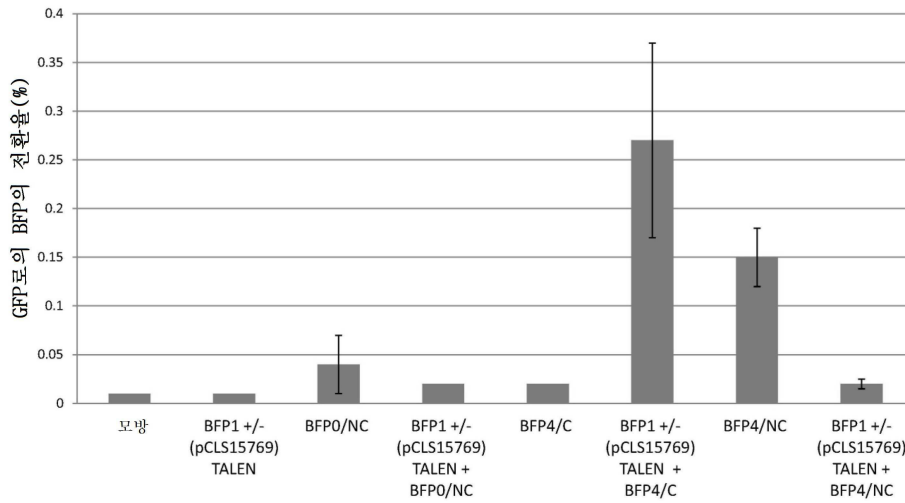
[0113]

[0114] 실시예 4: GRON + TALEN 니카제.



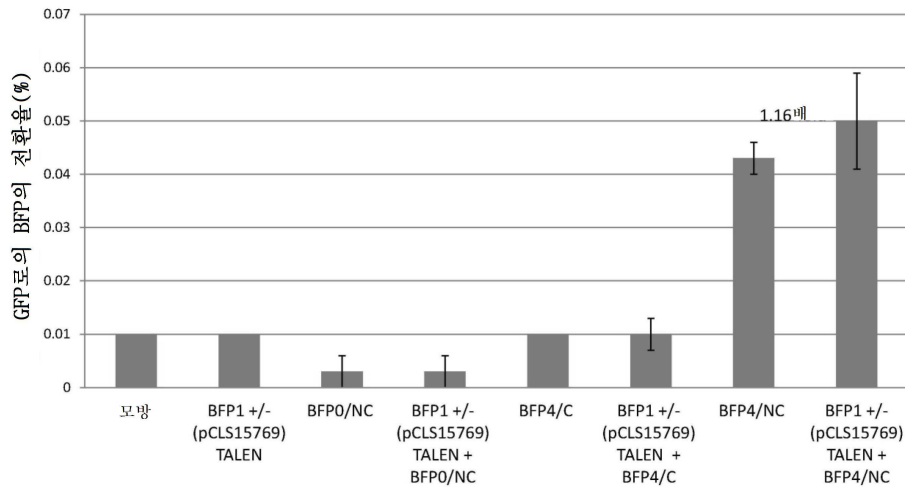
[0115]

[0116] 실시예 5: GRON + TALEN 니카제.



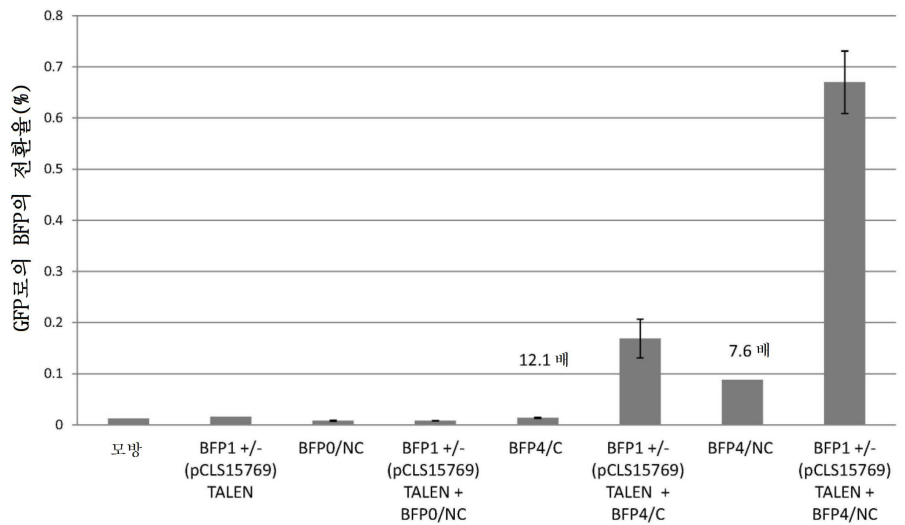
[0117]

[0118] 실시예 6: GRON + TALEN 니카제.



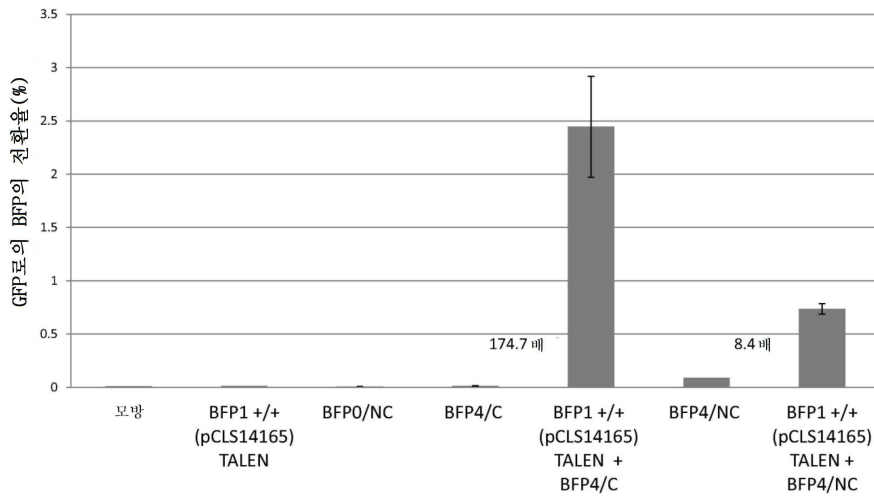
[0119]

[0120] 실시예 7: GRON + TALEN 니카제.



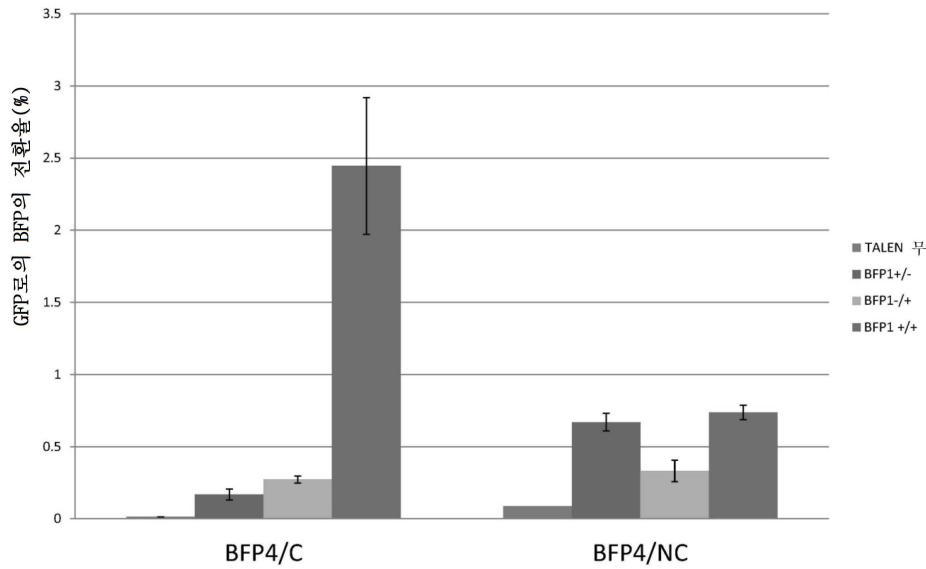
[0121]

[0122] **실시예 8:** GRON + TALEN DSB.



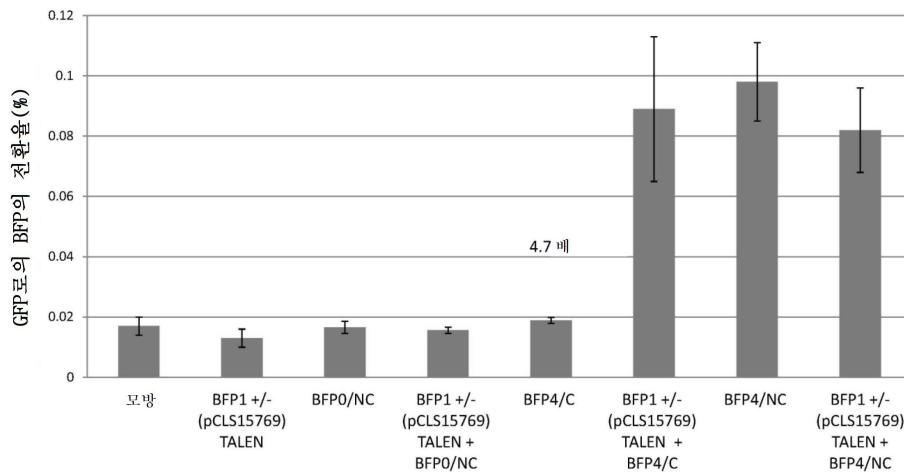
[0123]

[0124] **실시예 9:** GRON + TALEN.



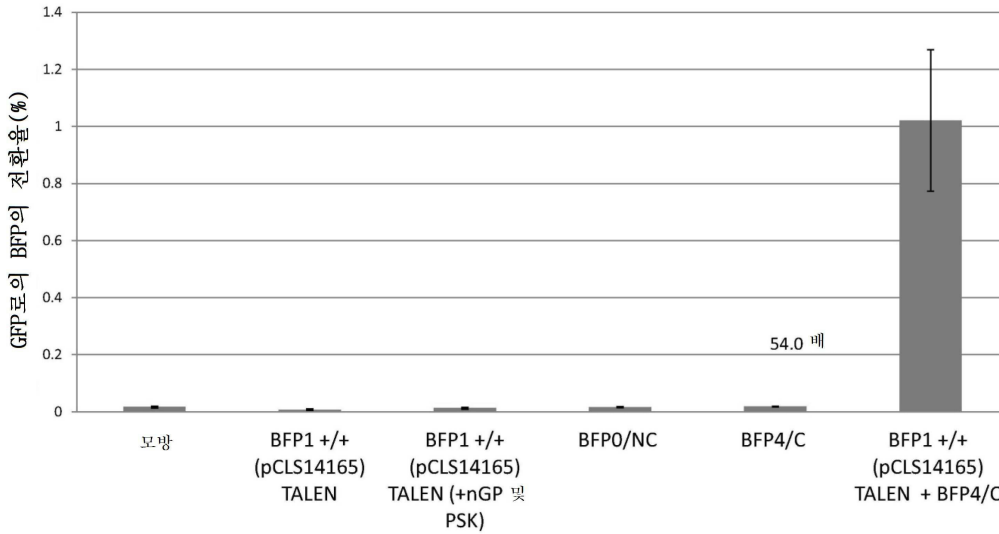
[0125]

[0126] **실시예 10:** GRON + TALEN 니카제.



[0127]

[0128] 실시예 11: GRON + TALEN DSB.



[0129]

[0130] 참조문헌

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J. 16, 735–743.

Mathur, J., Szabados, L, and Koncz, C. (1995) A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of Arabidopsis thaliana protoplasts. Plant Cell Rep. 14, 221-226

Fujikawa Y, Kato N (2007) Split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in Arabidopsis protoplasts. Plant J 52: 185–195

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

[0131]

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CIBUS US LLC

CIBUS EUROPE B.V.

<120> TARGETED GENE MODIFICATION USING OLIGONUCLEOTIDE-MEDIATED GENE REPAIR

<130> WO2014/144987

<140> PCT/US2014/029621

<141> 2014-03-14

<150> US 61/801,320

<151> 2013-03-15

<160> 6

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 1

vcctcgtga ccaccttcac ctacggcgtg cagtgcctca gch 43

<210> 2

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 2

vgctgaagca ctgcacgccg taggtgaagg tggtcacgag ggh 43

<210> 3

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 3

vcctcgtga ccaccttcac ccacggcgtg cagtgcctca gch 43

<210> 4

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 4

vgctgaagca ctgcacgccg tgggtgaagg tggtcacgag ggh 43

<210> 5

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> CDS

<222> (1)..(78)

<400> 5

ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc acc cac ggc gtg cag 48

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr His Gly Val Gln

1 5 10 15

tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag 78

Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

20 25

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr His Gly Val Gln

1 5 10 15

Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

20 25