

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292659** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.03.31**

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.10.10**

(54) **СОЗДАНИЕ МАИСА, УСТОЙЧИВОГО К СЕВЕРНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ**

(31) **62/407,867**

(72) Изобретатель:

(32) **2016.10.13**

**Гао Хойжун, Ли Байлинь, Мили  
Роберт Б., Перуджини Леандро  
Даниэль, Табор Гирма М. (US)**

(33) **US**

(62) **201990924; 2017.10.10**

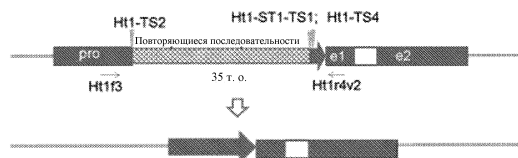
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

**ПАЙОНИР ХАЙ-БРЕД  
ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК. (US)**

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) В изобретении предусматриваются композиции и способы получения растительных клеток с модифицированными нуклеотидными последовательностями Ht1, модифицированными последовательностями NLB18 или как теми, так и другими. Способы предусматривают введение в геном маиса двухнитевых разрывов в эндогенной последовательности, кодирующей Ht1, эндогенной последовательности, кодирующей NLB18, или как в той, так и в другой, для модификации геномной последовательности с целью повышения устойчивости к северной пятнистости листьев растения, полученного из растительной клетки. Дополнительно предусматриваются способы, посредством которых вводят связанные с устойчивостью аллели Ht1 и/или NLB18 в специфические сайты в геноме. Также охватываются растения, полученные из растительных клеток, и семена, полученные от растений. Также предусматриваются направляющие полинуклеотиды для применения системы CRISPR-Cas в индуцировании двухнитевых разрывов.



202292659

A1

A1

202292659

**СОЗДАНИЕ МАИСА, УСТОЙЧИВОГО К СЕВЕРНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ**ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии и, более конкретно, к способам редактирования генома растительной клетки для получения кукурузы, устойчивой к северной пятнистости листьев.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Официальная копия данного перечня последовательностей предоставлена в электронном виде с помощью EFS-Web как перечень последовательностей в файле формата ASCII с названием 7156WO\_SEQLIST.txt, созданном 13 октября 2016 г. и имеющем размер 240 килобайтов, и подана одновременно с настоящим описанием. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью настоящего описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Северная пятнистость листьев (NLB), вызываемая патогенным грибом *Exserohilum turcicum* (ранее называемым *Helminthosporium turcicum*), представляет собой серьезное сосудистое заболевание листьев маиса во многих тропических условиях и умеренных условиях окружающей среды. Симптомы могут различаться от поражений в форме сигары на нижних листьях до полного разрушения листовой поверхности, за счет чего обеспечивается уменьшение размера площади листовой поверхности, доступной для фотосинтеза. Снижение фотосинтетической способности приводит к недостатку углеводов, необходимых для налива зерна, что влияет на урожай зерна. Области средних широт тропиков на высоте приблизительно 900-1600 м над уровнем моря характеризуются особенно благоприятным климатом для северной пятнистости листьев благодаря длительным периодам присутствия росы и умеренным значениям температуры. Однако северная пятнистость листьев может также приводить к потерям урожая на 30-50% в умеренных условиях окружающей среды, как, например, в Соединенных Штатах Америки во время периода дождей, особенно, если инфекция устанавливается на верхних листьях растения до стадии выметывания пестичных столбиков.

Наиболее эффективным и наиболее предпочтительным способом контроля северной пятнистости листьев является выращивание

устойчивых гибридов. Устойчивость к определенным штаммам патогена можно контролировать с помощью определенных нативных генов устойчивости маиса к заболеваниям, таких как *Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *Htm1*, *Htn1*, *HtN*, *HtP*, *ht4* и *rt* (Welz and Geiger 2000. *Plant Breeding*. 119(1):1-14; Ogliari et al. 2005. *Genet Mol Biol* 28:435-439; Hurni et al. 2015 *PNAS* 112(28):8780-5). Однако интрогрессия генов устойчивости в другие инбреды является трудной задачей, что может или не может привести к ухудшению урожая ввиду шлейфа от сцепления. Существует необходимость в получении растений маиса, устойчивых к северной пятнистости листьев, с большей эффективностью и путем, с помощью которого уменьшат шлейф от сцепления, ассоциированный с интрогрессией нескольких локусов устойчивости в элитные линии маиса посредством традиционных способов.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Ограничения традиционной селекции в отношении интрогрессии устойчивости к северной пятнистости листьев в линии маиса можно преодолеть путем редактирования генов, которые придают повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, таких как, например, *Ht1* и *NLB18*, или путем перемещения связанных с устойчивостью аллелей *Ht1* и *NLB18* к другому сайту в геноме, так что повышенная устойчивость к северной пятнистости листьев может быть достигнута посредством интрогрессии одного геномного локуса, содержащего множество нуклеотидных последовательностей, каждая из которых придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, в растения маиса.

В данном документе предусматриваются способы получения клетки растения маиса с модифицированной нуклеотидной последовательностью *Ht1*. Способы предусматривают введение двухнитевого разрыва или сайт-специфической модификации в один или несколько целевых сайтов в эндогенной последовательности, кодирующей HT1, в клетке растения маиса, и получение клетки растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *Ht1*. Способ может дополнительно предусматривать введение матрицы для замены *Ht1* в клетку растения маиса, где указанная матрица для замены *Ht1* содержит по меньшей мере одно изменение нуклеиновой кислоты по сравнению с эндогенной последовательностью, кодирующей HT1, и где указанная матрица для замены *Ht1* включена в эндогенную последовательность, кодирующую HT1. Двухнитевый разрыв может быть индуцирован с

помощью нуклеазы, такой как без ограничения TALEN, мегануклеаза, нуклеаза с цинковыми пальцами или нуклеаза, ассоциированная с CRISPR. Способ может дополнительно предусматривать выращивание растения маиса из клетки растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *Ht1*, и при этом растение маиса может проявлять повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев.

В некоторых аспектах модифицированная нуклеотидная последовательность *Ht1* предусматривает делецию в промоторе эндогенной последовательности, кодирующей HT1. Способы могут предусматривать применение эндонуклеазы Cas9 и одной или нескольких направляющих РНК. В одном варианте осуществления применяют по меньшей мере две направляющие РНК, причем первая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:1 [Ht1-TS2], а вторая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:2 [Ht1-TS4]. В другом варианте осуществления первая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:1 [Ht1-TS2], а вторая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:3 [Ht1-ST1-TS1].

В других аспектах используют матрицу для замены *Ht1*, которая содержит нуклеотидную последовательность *Ht1* из PH4GP (Ht1-PH4GP). Нуклеотидная последовательность Ht1-PH4GP может содержать SEQ ID NO:59. В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность Ht1-PH4GP может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% SEQ ID NO:52, где полипептид придает устойчивость к северной пятнистости листьев. Нуклеотидная последовательность Ht1-PH4GP может также содержать SEQ ID NO:65. Способы могут предусматривать применение эндонуклеазы Cas9 и одной или нескольких направляющих РНК. В одном варианте осуществления применяют по меньшей мере две направляющие РНК, причем первая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:14 [Ht1-TS6], а вторая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:16 [Ht1-TS9]. В другом варианте осуществления первая направляющая РНК содержит переменный

нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:15 [Ht1-TS7], а вторая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:17 [Ht1-TS10]. В данном документе предусматриваются способы получения клетки растения маиса с модифицированной нуклеотидной последовательностью *NLB18*. Способы предусматривают введение двухнитевого разрыва или сайт-специфической модификации в один или несколько целевых сайтов в эндогенной последовательности, кодирующей *NLB18*, в клетке растения маиса, и получение растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *NLB18*. Способы могут дополнительно предусматривать введение матрицы для замены *NLB18* в клетку растения маиса, где указанная матрица для замены *NLB18* содержит по меньшей мере одно изменение нуклеиновой кислоты по сравнению с эндогенной последовательностью, кодирующей *NLB18*, и где указанная матрица для замены *NLB18* включена в эндогенную последовательность, кодирующую *NLB18*. Двухнитевый разрыв может быть индуцирован с помощью нуклеазы, такой как без ограничения TALEN, мегануклеаза, нуклеаза с цинковыми пальцами или нуклеаза, ассоциированная с CRISPR. Способ может дополнительно предусматривать выращивание растения маиса из клетки растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *NLB18*, и при этом растение маиса может проявлять повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев.

В некоторых аспектах модифицированная нуклеотидная последовательность *NLB18* содержит модификацию в промоторе эндогенной последовательности, кодирующей *NLB18*. В некоторых вариантах осуществления модификация в промоторе эндогенной последовательности, кодирующей *Ht1*, предусматривает делецию участка повторяющихся последовательностей в промоторе *Ht1*. В одном варианте осуществления модификация в промоторе эндогенной последовательности, кодирующей *Ht1*, предусматривает делецию SEQ ID NO: 71 из промотора *Ht1*.

В других аспектах используют матрицу для замены *NLB18*, которая содержит нуклеотидную последовательность *NLB18* из RH26N или RH99N (*NLB18*-RH26N или *NLB18*-RH99N). В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность *NLB18*-RH26N содержит любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

или 99% SEQ ID NO:64, где полипептид придает устойчивость к северной пятнистости листьев. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность NLB18-PH26N содержит SEQ ID NO:70. Нуклеотидная последовательность NLB18-PH99N может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% SEQ ID NO:62, где полипептид придает устойчивость к северной пятнистости листьев. Способы могут предусматривать применение эндонуклеазы Cas9 и одной или нескольких направляющих РНК. В одном варианте осуществления применяют по меньшей мере две направляющие РНК, причем первая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:30 [NLB18-TS1], а вторая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:32 [NLB18-TS4]. В другом варианте осуществления первая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:31 [NLB18-TS8], а вторая направляющая РНК содержит переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:32 [NLB18-TS4].

В данном документе предусматриваются способы получения клетки растения маиса с редактированным геномным локусом, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев. Способы предусматривают 1) введение двухнитевого разрыва или сайт-специфической модификации в один или несколько целевых сайтов в геномном локусе клетки растения маиса; 2) введение одной или нескольких нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептид, который придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, где каждая нуклеотидная последовательность фланкирована 300-500 смежными нуклеотидами нуклеотидных последовательностей, расположенных 5' или 3' относительно соответствующих целевых сайтов; и 3) получение клетки растения маиса, имеющей геномный локус, содержащий одну или несколько нуклеотидных последовательностей, которые придают повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев. Двухнитевый разрыв или сайт-специфическая модификация могут быть индуцированы с помощью нуклеазы, такой как без ограничения TALEN, мегануклеаза, нуклеаза с цинковыми пальцами или нуклеаза, ассоциированная с CRISPR. Способ может дополнительно

предусматривать выращивание растения маиса из клетки растения маиса, имеющей редактированный геномный локус, содержащий по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая обеспечивает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, и при этом растение маиса может проявлять повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев.

В некоторых аспектах редактированная растительная клетка содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, включающих любое из следующего: *Ht1-PH4GP* (SEQ ID NO: 51), *NLB18-PH26N* (SEQ ID NO: 63) и *NLB18-PH99N* (SEQ ID NO: 61). В других аспектах геномный локус представляет собой CTL1. Нуклеотидная последовательность *Ht1-PH4GP* может содержать SEQ ID NO:59 или любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% SEQ ID NO:52, где полипептид придает повышенную устойчивость растению маиса к северной пятнистости листьев. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность *Ht1-PH4GP* содержит SEQ ID NO:65. Нуклеотидная последовательность *NLB18-PH26N* может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% SEQ ID NO:64, где полипептид придает повышенную устойчивость растению маиса к северной пятнистости листьев. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность *NLB18-PH26N* содержит SEQ ID NO:70. Нуклеотидная последовательность *NLB18-PH99N* может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% SEQ ID NO:62, где полипептид придает повышенную устойчивость растению маиса к северной пятнистости листьев.

В еще других аспектах нуклеотидная последовательность, кодирующая *NLB18-PH26N*, нацелена на TS8 CTL1; нуклеотидная последовательность, кодирующая *NLB18-PH4GP*, нацелена на TS10 CTL1; и/или нуклеотидная последовательность, кодирующая *NLB18-PH26N*, нацелена на TS45 CTL1.

В одном аспекте способ редактирования растительной клетки предусматривает применение эндонуклеазы Cas9 в качестве

средства, индуцирующего DSB, и одной или нескольких направляющих РНК для нацеливания Cas9 на сайты в локусе CTL1. Одна направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:36 [CTL1-TS8]; одна направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:37 [CTL1-TS10], и одна направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:38 [CTL1-TS45].

Также предусматриваются клетки растений маиса, полученные с помощью способов, предусмотренных в данном документе, а также растения маиса, продуцирующие клетки растений маиса и семена, продуцируемые растениями маиса.

В данном документе также предусматриваются направляющие полинуклеотиды, содержащие переменные нацеливающие домены, комплементарные целевым сайтам в эндогенной последовательности, кодирующей *Ht1*, эндогенной последовательности, кодирующей *NLB18*, или геномный локус CTL1. Направляющие полинуклеотиды могут представлять собой последовательности РНК, последовательности ДНК или комбинированные последовательности РНК-ДНК. Для *Ht1* направляющие полинуклеотиды могут иметь переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, или SEQ ID NO:3. Для *NLB18* направляющие полинуклеотиды могут иметь переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, или SEQ ID NO:32. Для CTL1 направляющие полинуклеотиды могут иметь переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, или SEQ ID NO:38.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ И ПЕРЕЧНЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

На фиг. 1 показано схематическое изображение локуса *Ht1*; расположение каждого целевого сайта в геномной последовательности *Ht1* для делеции повторяющейся последовательности в промоторном участке; и положения праймеров, используемых для проверки. Интроны между экзонами выделены белым цветом, а целевые сайты обозначены треугольниками вверх. E1 представляет собой экзон 1; e2 представляет собой экзон 2; а про представляет собой промоторный участок.

На фиг. 2A и 2B показаны ожидаемые последовательности участков границы сплайсинга после удаления повторяющихся последовательностей в промоторном участке гена *Ht1*. На фигуре 2A показана ожидаемая последовательность участков границы



сплайсинга CR2/CR4 (последовательности, выделенные курсивом, являются последовательностями TS2, а подчеркнутые последовательности являются последовательностями TS4). На фигуре 2В показана ожидаемая последовательность участков границы сплайсинга CR2/ST1-CR1 (последовательности, выделенные курсивом, являются последовательностями TS2, а подчеркнутые последовательности являются последовательностями ST1-TS1). Участки в рамке указывают на участки границы сплайсинга.

На фиг. 3 показано положение каждого целевого сайта и схематическое изображение обмена аллелями *Ht1*. Аллель *Ht1* RH4GP показан темно-серым, а аллель, который он заменяет, показан светло-серым.

На фиг. 4 показаны положения праймеров, применяемых для оценки обмена аллелями *Ht1*.

На фиг. 5 показано положение каждого целевого сайта и схематическое изображение обмена аллелями NLB18.

На фиг. 6 показано положение трех локусов, содержащих целевые сайты (TS8, TS45 и TS10) для системы направляющая РНК/эндонуклеаза Cas в CTL1 на хромосоме 1 маиса.

На фиг. 7 показано схематическое изображение вставки NLB18-RH26N в TS8.

На фиг. 8 показано схематическое изображение вставки *Ht1*-RH4GP в TS10.

На фиг. 9 показано схематическое изображение вставки NLB18-RH26N в TS45.

На фиг. 10 показана экспрессия NLB18 с применением qRT-PCR в растениях маиса T2 TS45 NLB18-BC26N.

На фиг. 11 показана экспрессия *Ht1* с применением qRT-PCR в растениях маиса T2 TS10 *Ht1*-ED4GP.

SEQ ID NO:1 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта *Ht1*-TS2.

SEQ ID NO:2 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта *Ht2*-TS4.

SEQ ID NO:3 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта *Ht1*-ST1-TS1.

SEQ ID NO:4 представляет собой нуклеотидную последовательность гена Cas9.

SEQ ID NO:5 представляет собой аминокислотную последовательность одинарного аминоконцевого сигнала внутриядерной локализации SV40.

SEQ ID NO:6 представляет собой нуклеотидную последовательность промотора U6 полимеразы III.

SEQ ID NO:7 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК Ht1-CR2.

SEQ ID NO:8 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК Ht1-CR4.

SEQ ID NO:9 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК Ht1-ST1-CR1.

SEQ ID NO:10 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для Ht1f3.

SEQ ID NO:11 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для Ht1r4v2.

SEQ ID NO:12 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера, применяемого во второй реакции ПЦР.

SEQ ID NO:13 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера, применяемого во второй реакции ПЦР.

SEQ ID NO:14 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта Ht1-TS6.

SEQ ID NO:15 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта HT1-TS7.

SEQ ID NO:16 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта HT1-TS9.

SEQ ID NO:17 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта HT1-TS10.

SEQ ID NO:18 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК HT1-CR6.

SEQ ID NO:19 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК HT1-CR9.

SEQ ID NO:20 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК HT1-CR7.

SEQ ID NO:21 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую

РНК HT1-CR10.

SEQ ID NO:22 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для Ht1HR1f1.

SEQ ID NO:23 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для Ht1HR1r1.

SEQ ID NO:24 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для Ht1HR2f1.

SEQ ID NO:25 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для Ht1HR2r1.

SEQ ID NO:26 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для hdr2b\_f.

SEQ ID NO:27 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для hdr2b\_r.

SEQ ID NO:28 представляет собой нуклеотидную последовательность зонда hdr2b\_PV.

SEQ ID NO:29 представляет собой нуклеотидную последовательность зонда hdr2b\_PG.

SEQ ID NO:30 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта NLB18-TS1.

SEQ ID NO:31 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта NLB18-TS8.

SEQ ID NO:32 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта NLB18-TS4.

SEQ ID NO:33 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК NLB18-CR1.

SEQ ID NO:34 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК NLB18-CR8.

SEQ ID NO:35 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК NLB18-CR4.

SEQ ID NO:36 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта CTL1-TS8.

SEQ ID NO:37 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта CTL1-TS45.

SEQ ID NO:38 представляет собой нуклеотидную последовательность целевого сайта CTL1-TS10.

SEQ ID NO:39 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для 8HR1f1.

SEQ ID NO:40 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для PH26NPr.

SEQ ID NO:41 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для PH26NTf.

SEQ ID NO:42 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для 8HR2r1.

SEQ ID NO:43 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для 10HR1f.

SEQ ID NO:44 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для Ht1Pr.

SEQ ID NO:45 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для Ht1Tf.

SEQ ID NO:46 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для 10HR2r.

SEQ ID NO:47 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для 45hr1f1.

SEQ ID NO:48 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для PH26NPr.

SEQ ID NO:49 представляет собой нуклеотидную последовательность прямого праймера для PH26NTf.

SEQ ID NO:50 представляет собой нуклеотидную последовательность обратного праймера для 45hr2r1.

SEQ ID NO:51 представляет собой нуклеотидную последовательность cDNA Ht1, обнаруженную в инбредной линии PH4GP.

SEQ ID NO:52 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого SEQ ID NO:51.

SEQ ID NO:53 представляет собой нуклеотидную последовательность cDNA Ht1, обнаруженную в инбредной линии PH1W2.

SEQ ID NO:54 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого SEQ ID NO:53.

SEQ ID NO:55 представляет собой нуклеотидную последовательность cDNA Ht1, обнаруженную в инбредной линии B73, и в данном документе называемую "аллелем B73-high".

SEQ ID NO:56 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого SEQ ID NO:55.

SEQ ID NO:57 представляет собой нуклеотидную последовательность cDNA Ht1, обнаруженную в инбредной линии B73, и в данном документе называемую "аллелем B73-low".

SEQ ID NO:58 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого SEQ ID NO:57.

SEQ ID NO:59 представляет собой нуклеотидную последовательность геномной ДНК *Ht1*, обнаруженную в инбредной линии PH4GP.

SEQ ID NO:60 представляет собой аминокислотную последовательность участка, обнаруженного в полипептидах *Ht1* аллелей, связанных с устойчивостью.

SEQ ID NO:61 представляет собой последовательность cDNA NLB18 из PH99N.

SEQ ID NO:62 представляет собой аминокислотную последовательность белка, кодируемого SEQ ID NO:61.

SEQ ID NO:63 представляет собой последовательность cDNA NLB18 из PH26N.

SEQ ID NO:64 представляет собой аминокислотную последовательность белка, кодируемого SEQ ID NO:63.

SEQ ID NO:65 представляет собой нуклеотидную последовательность ZM-HT1-PH4GP, содержащую промотор ZM-HT1-PH4GP, экзон 1, интрон 1 и терминатор.

SEQ ID NO:66 представляет собой нуклеотидную последовательность NLB18 из PH184C, в том числе от 5' NLB18-CR8 по 3' NLB18-CR4.

SEQ ID NO:67 представляет собой последовательность плеча гомологии, фланкирующую 5' NLB18-TS1 в PH184C.

SEQ ID NO:68 представляет собой последовательность плеча гомологии, фланкирующую 3' NLB18-TS4 в PH184C.

SEQ ID NO:69 представляет собой последовательность плеча гомологии, фланкирующую 5' NLB18-TS8 в PH184C.

SEQ ID NO:70 представляет собой нуклеотидную последовательность NLB18 из PH26N, содержащую промотор NLB18 PH26N, экзон 1, интрон 1, экзон 2, интрон 2, экзон 3 и терминатор.

SEQ ID NO:71 представляет собой нуклеотидную последовательность участка повторяющихся последовательностей в промоторе *Ht1* PH184C.

SEQ ID NO:72 представляет собой нуклеотидную последовательность кассеты экспрессии, включающую убиквитиновый промотор *Zea mays*, 5'-UTR гена убиквитина ZM, интрон 1 гена убиквитина ZM, сигнал внутриядерной локализации SV40, экзон 1 Cas9 (ST1), интрон LS1 картофеля, экзон 2 Cas9 (ST1), сигнал

внутриядерной локализации эндонуклеазы VirD2 и терминатор pinII.

SEQ ID NO:73 представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую Cas9, используемую в примере 4; SEQ ID NO:73 содержит экзон 1 (SP) cas9, интрон 2 ST-LS1, экзон 2 (SP) Cas9 и сигнал внутриядерной локализации VirD2.

SEQ ID NO:74 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК ZM-U6:08CR1.

SEQ ID NO:75 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК ZM-U6:45CR1.

SEQ ID NO:76 представляет собой нуклеотидную последовательность ДНК, способной экспрессировать направляющую РНК ZM-U6:10CR3.

SEQ ID NO:77 представляет собой нуклеотидную последовательность матрицы для репарации 8CR1HR2 геномной последовательности 08CR1HR1-NLB18 (PH26N), нацеленной на TS8 CTL1.

SEQ ID NO:78 представляет собой нуклеотидную последовательность матрицы для репарации 45CR1HR2 геномной последовательности 45CR1HR1-NLB18 (PH26N), нацеленной на TS45 CTL1.

SEQ ID NO:79 представляет собой нуклеотидную последовательность матрицы для репарации 10CR3HR2 геномной последовательности 10CR3HR1-HT1 (PH4GP), нацеленной на TS10 CTL1.

SEQ ID NO:80 представляет собой аминокислотную последовательность двухсоставной последовательности сигнала внутриядерной локализации карбоксильного конца эндонуклеазы VirD2 для пограничных участков Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*.

SEQ ID NO:81 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 5' HT1-TS6 в PH184C (пример 2).

SEQ ID NO:82 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 3' HT1-TS9 в PH184C (пример 2).

SEQ ID NO:83 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 5' HT1-TS7 в PH184C (пример 2).

SEQ ID NO:84 представляет собой нуклеотидную

последовательность плеча гомологии, фланкирующую 5' HT1-TS10 в PH184C (пример 2).

SEQ ID NO:85 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 5' STL1-TS8 в PH184C (пример 4).

SEQ ID NO:86 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 3' STL1-TS8 в PH184C (пример 4).

SEQ ID NO:87 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 5' STL1-TS45 в PH184C (пример 4).

SEQ ID NO:88 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 3' STL1-TS45 в PH184C (пример 4).

SEQ ID NO:89 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 5' STL1-TS10 в PH184C (пример 4).

SEQ ID NO:90 представляет собой нуклеотидную последовательность плеча гомологии, фланкирующую 3' STL1-TS10 в PH184C (пример 4).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Также следует понимать, что терминология, применяемая в данном документе, предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевается как ограничивающая. Используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения термины в единственном числе и формы единственного числа, например, включают объекты во множественном числе, если только смысл явно не подразумевает иное. Таким образом, например, ссылка на "растение", "определенное растение" или "некоторое растение" также включает несколько растений; также, в зависимости от контекста, применение термина "растение" также включает генетически подобного или идентичного потомства такого растения; применение термина "нуклеиновая кислота" необязательно на практике включает множество копий такой молекулы нуклеиновой кислоты; аналогичным образом, термин "зонд" необязательно (и как правило) охватывает множество подобных или идентичных молекул зондов. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение, если явно не

указано иное.

Композиции и способы представлены в данном документе для редактирования генома маиса с целью получения растений маиса, которые характеризуются повышенной устойчивостью к северной пятнистости листьев.

Термин "аллель" относится к одной из двух или более различных нуклеотидных последовательностей, которые находятся в определенном локусе.

"*Exserohilum turcicum*", ранее называемый *Helminthosporium turcicum*, представляет собой патогенный грибок, который вызывает инфекцию северной пятнистости листьев. Патогенный грибок в данном документе также называется *Exserohilum* или *Et.*

"Устойчивость к заболеваниям" (как, например, устойчивость к северной пятнистости листьев) является характерной особенностью растений, где у растения устраняются, сводятся к минимуму, уменьшаются симптомы заболевания, являющиеся результатом взаимодействий растения и патогена, таких как взаимодействия маиса и *Exserohilum turcicum*. Иными словами, патогены не вызывают заболеваний растений и связанных с ними симптомов заболеваний или, в качестве альтернативы, симптомы заболевания, вызванные патогеном, сводятся к минимуму или уменьшаются.

"Локус" представляет собой положение на хромосоме, где локализован ген или маркер.

"Устойчивость" является относительным термином, указывающим на то, что инфицированное растение характеризуется лучшим здоровьем растения или производит лучший урожай маиса, чем другое, обработанное таким же образом, более восприимчивое растение. Иными словами, условия вызывают сокращение снижения выживаемости маиса, роста и/или урожая у устойчивого растения маиса по сравнению с восприимчивым растением маиса. Специалисту будет понятно, что устойчивость растений маиса к северной пятнистости листьев или патогену, вызывающему ее, может предусматривать спектр более устойчивых или менее устойчивых фенотипов, и может варьировать в зависимости от тяжести инфекции. Однако путем простого наблюдения специалист может определить относительную устойчивость или чувствительность различных растений, линий растений или семейств растений к северной пятнистости листьев, и более того, также будет распознавать фенотипические градации "устойчивого". Например,



можно использовать визуальную оценку от 1 до 9 для определения уровня устойчивости к северной пятнистости листьев. Более высокий показатель указывает на более высокую устойчивость. Данные следует собирать только при существовании достаточного давления отбора в эксперименте с измерениями. Термины "толерантность" и "устойчивость" применяются в данном документе взаимозаменяемо.

Устойчивость может быть "только что приобретенная" или "повышенная". "Только что приобретенная" или "повышенная" устойчивость относится к повышенному уровню устойчивости к определенному патогену, широкому спектру патогенов или инфекции, вызванной патогеном(патогенами). Повышенный уровень устойчивости к конкретному патогенному грибу, такому как *Et*, например, представляет собой "повышенную" или улучшенную устойчивость к грибам. Варианты осуществления могут обеспечивать усиление или улучшение устойчивости растений к патогенному грибу.

#### *I. Редактирование генов*

В некоторых вариантах осуществления редактирование генов может быть облегчено посредством индукции двухнитевого разрыва ("DSB") в определенном положении в геноме вблизи желаемого изменения. DSB могут быть индуцированы с применением любого доступного средства, индуцирующего DSB, в том числе без ограничения TALEN, мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами, системы Cas9-gRNA (основанные на бактериальных системах CRISPR-Cas) и т. п. В некоторых вариантах введение DSB можно комбинировать с введением матрицы для модификации полинуклеотида.

Матрица для модификации полинуклеотида может быть введена в клетку любым способом, известным из уровня, таким как без ограничения способы временного введения, трансфекция, электропорация, микроинъекция, опосредованная частицами доставка, местное применение, опосредованная вискерами доставка, доставка посредством проникающих в клетку пептидов или прямая доставка, опосредованная наночастицами мезопористого диоксида кремния (MSN).

Матрица для модификации полинуклеотида может быть введена в клетку в виде одонитевой полинуклеотидной молекулы, двухнитевой полинуклеотидной молекулы или как часть кольцевой ДНК (векторной ДНК). Матрица для модификации полинуклеотида также может быть связана с направляющей РНК и/или эндонуклеазой Cas. Связанные

ДНК могут обеспечивать совместную локализацию целевой и матричной ДНК, пригодную для редактирования генома и целевой регуляции генома, а также могут быть пригодны для нацеливания на постмитотические клетки, где ожидается, что функция механизма эндогенной гомологичной рекомбинации HR будет сильно снижена (Mali et al. 2013 *Nature Methods* Vol. 10: 957–963.) Матрица для модификации полинуклеотида может временно присутствовать в клетке, или она может быть введена посредством вирусного репликона.

"Модифицированный нуклеотид" или "редактированный нуклеотид" относится к представляющей интерес нуклеотидной последовательности, которая содержит по меньшей мере одно изменение по сравнению с немодифицированной нуклеотидной последовательностью. Такие "изменения" предусматривают, например, (i) замещение по меньшей мере одного нуклеотида, (ii) делецию по меньшей мере одного нуклеотида, (iii) вставку по меньшей мере одного нуклеотида или (iv) любую комбинацию из (i)–(iii). "Редактированная клетка" или "редактированная растительная клетка" относится к клетке, содержащей по меньшей мере одно изменение в геномной последовательности по сравнению с контрольной клеткой или растительной клеткой, которые не включают такое изменение в геномной последовательности.

Используемый в данном документе термин "матрица для модификации полинуклеотида" или "матрица для модификации" относится к полинуклеотиду, который содержит по меньшей мере одну модификацию нуклеотида по сравнению с целевой нуклеотидной последовательностью, подлежащей редактированию. Модификация нуклеотида может представлять собой по меньшей мере одну замену, добавление или делецию нуклеотида. Необязательно матрица для модификации полинуклеотида может дополнительно содержать гомологичные нуклеотидные последовательности, фланкирующие по меньшей мере одну нуклеотидную модификацию, где фланкирующие гомологичные нуклеотидные последовательности обеспечивают достаточную гомологию с желаемой нуклеотидной последовательностью, подлежащей редактированию.

Способ редактирования геномной последовательности, комбинирующий DSB и матрицы для модификации, обычно предусматривает предоставление клетке-хозяину средства, индуцирующего DSB, или нуклеиновой кислоты, кодирующей средство, индуцирующее DSB, которое распознает целевую последовательность

в хромосомной последовательности, и где средство, индуцирующее DSB, способно индуцировать DSB в геномной последовательности; и предоставление по меньшей мере одной матрицы для модификации полинуклеотида, содержащей по меньшей мере одно изменение нуклеотида по сравнению с нуклеотидной последовательностью, подлежащей редактированию. Эндонуклеаза может быть предоставлена клетке любым способом, известным из уровня техники, например, без ограничения с помощью способов временного введения, трансфекции, микроинъекции и/или местного применения или опосредованно с помощью конструкций для рекомбинации. Эндонуклеаза может быть предоставлена в виде белка или в виде направляющего полинуклеотидного комплекса непосредственно в клетку или опосредованно через конструкции для рекомбинации. Эндонуклеаза может быть введена в клетку временно или может быть включена в геном клетки-хозяина с применением любого способа, известного из уровня техники. В случае системы CRISPR-Cas поглощение эндонуклеазы и/или направляющего полинуклеотида в клетку может быть облегчено с помощью пептида, проникающего в клетки (CPP), как описано в WO2016073433.

Используемый в данном документе термин "геномный участок" относится к сегменту хромосомы в геноме клетки. В одном варианте осуществления геномный участок включает сегмент хромосомы в геноме растительной клетки, который присутствует на любой стороне целевого сайта или, в качестве альтернативы, также содержит часть целевого сайта. Геномный участок может содержать по меньшей мере 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45, 5-50, 5-55, 5-60, 5-65, 5-70, 5-75, 5-80, 5-85, 5-90, 5-95, 5-100, 5-200, 5-300, 5-400, 5-500, 5-600, 5-700, 5-800, 5-900, 5-1000, 5-1100, 5-1200, 5-1300, 5-1400, 5-1500, 5-1600, 5-1700, 5-1800, 5-1900, 5-2000, 5-2100, 5-2200, 5-2300, 5-2400, 5-2500, 5-2600, 5-2700, 5-2800, 5-2900, 5-3000, 5-3100 или более оснований, так что геномный участок обладает достаточной гомологией, чтобы подвергаться гомологичной рекомбинации с соответствующим участком гомологии.

TAL-эффекторные нуклеазы (TALEN) являются классом нуклеаз, специфичных для определенных последовательностей, которые можно применять для получения двухнитевых разрывов в конкретных целевых последовательностях в геноме растения или другого организма. (См. Miller et al. (2011) *Nature Biotechnology* 29:143-148).

Эндонуклеазы представляют собой ферменты, которые расщепляют фосфодиэфирную связь в цепи полинуклеотида. Эндонуклеазы включают рестрикционные эндонуклеазы, которые расщепляют ДНК в специфических сайтах без повреждения оснований, и мегануклеазы, также известные как хоминг-эндонуклеазы (HEазы), которые, как рестрикционные эндонуклеазы, связывают и разрезают специфические сайты распознавания, однако сайты распознавания для мегануклеаз обычно длиннее, около 18 п. о. или больше (заявка на патент PCT/US12/30061, поданная 22 марта 2012 г.). Мегануклеазы были распределены в четыре семейства на основе консервативных мотивов последовательностей, при этом семейства представляют собой семейства LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H и His-Cys-бокс. Эти мотивы участвуют в координации ионов металлов и гидролизе фосфодиэфирных связей. HEазы примечательны своими длинными сайтами распознавания и тем, что допускают некоторые полиморфизмы последовательностей в их ДНК-субстратах. Правила номенклатуры мегануклеаз похожи на правила для других рестрикционных эндонуклеаз. Мегануклеазы также характеризуют по приставке F-, I- или PI- для ферментов, кодируемых соответственно автономными ORF, интронами и интеинами. Одна стадия в процессе рекомбинации включает расщепление полинуклеотида в сайте распознавания или рядом с ним. Эту расщепляющую активность можно использовать для получения двухнитевого разрыва. Обзоры сайт-специфических рекомбиназ и их сайтов рестрикции см. в Sauer (1994) *Curr Op Biotechnol* 5:521-7 и Sadowski, (1993) *FASEB* 7:760-7. В некоторых примерах рекомбиназы относятся к семействам интеграз или резольваз.

Нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) представляют собой сконструированные индуцирующие двухнитевый разрыв средства, содержащие ДНК-связывающий домен с цинковыми пальцами и домен индуцирующего двухнитевый разрыв средства. Специфичность сайта распознавания обеспечивается доменом с цинковыми пальцами, который обычно содержит два, три или четыре цинковых пальца, например, имеющих структуру C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, тем не менее известны и были сконструированы другие структуры с цинковыми пальцами. Домены с цинковыми пальцами являются поддающимися конструированию полипептидами, которые специфично связывают выбранную полинуклеотидную последовательность распознавания. ZFN включают сконструированный ДНК-связывающий домен с цинковыми пальцами, связанный с неспецифичным эндонуклеазным доменом, например,

нуклеазным доменом от эндонуклеазы II типа, таким как FokI. Дополнительные функциональные средства можно присоединять к связывающему домену с цинковыми пальцами, в том числе домены активаторов транскрипции, домены репрессоров транскрипции и метилазы. В некоторых примерах димеризация нуклеазного домена необходима для расщепляющей активности. Каждый цинковый палец распознает три последовательные пары оснований в целевой ДНК. Например, 3-пальцевый домен распознает последовательность из 9 смежных нуклеотидов; при необходимости димеризации нуклеазы используют два набора триплетов цинковых пальцев для связывания последовательности распознавания из 18 нуклеотидов.

Редактирование генома с использованием средств, индуцирующих DSB, таких как комплексы Cas9-gRNA, описано, например, в заявке на патент США US 2015-0082478 A1, WO2015/026886 A1, WO2016007347 и WO201625131, все из которых включены посредством ссылки в данный документ.

Термин "ген Cas" в данном документе относится к гену, который, как правило, соединен, связан или расположен вблизи или рядом с фланкирующими локусами CRISPR в бактериальных системах. Термины "ген Cas", "CRISPR-ассоциированный (Cas) ген" используются в данном документе взаимозаменяемо. Термин "эндонуклеаза Cas" в данном документе относится к белку или комплексу белков, кодируемых геном Cas. Раскрытая в данном документе эндонуклеаза Cas, если она находится в комплексе с подходящим полинуклеотидным компонентом, способна распознавать, связываться и необязательно разрезать или расщеплять всю или часть определенной целевой последовательности ДНК. Эндонуклеаза Cas, описанная в данном документе, содержит один или несколько нуклеазных доменов. Эндонуклеазы Cas по настоящему изобретению включают таковые, которые имеют HNH или HNH-подобный нуклеазный домен и/или RuvC или RuvC-подобный нуклеазный домен. Эндонуклеаза Cas по настоящему изобретению может включать белок Cas9, белок Cpf1, белок C2c1, белок C2c2, белок C2c3, Cas3, Cas5, Cas7, Cas8, Cas10 или их комплексы.

Используемые в данном документе термины "комплекс направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas", "система направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas", "комплекс направляющий полинуклеотид/Cas", "система направляющий полинуклеотид/Cas", "система направленной Cas" используются взаимозаменяемо в данном документе и относятся к по меньшей мере

одному направляющему полинуклеотиду и к по меньшей мере одной эндонуклеазе Cas, которые способны образовывать комплекс, где указанный комплекс направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas может направлять эндонуклеазу Cas в целевой сайт ДНК, обеспечивая распознавание, связывание и необязательно разрезание или расщепление (введение однонитевого или двухнитевого разрыва) целевого сайта ДНК эндонуклеазой Cas. Комплекс направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas в данном документе может содержать белок(белки) Cas и подходящий(подходящие) полинуклеотидный(полинуклеотидные) компонент(компоненты) любой из четырех известных систем CRISPR (Horvath and Barrangou, 2010, *Science* 327: 167-170), таких как система CRISPR типа I, II или III. Эндонуклеаза Cas раскручивает ДНК-дуплекс в месте целевой последовательности и необязательно расщепляет по меньшей мере одну нить ДНК, что опосредуется распознаванием целевой последовательности с помощью полинуклеотида (такого как без ограничения crRNA или направляющая РНК), который находится в комплексе с белком Cas. Такое распознавание и разрезание целевой последовательности эндонуклеазой Cas, как правило, происходит, если на 3'-конце целевой последовательности ДНК или вблизи него расположен правильный прилегающий к протоспейсеру мотив (PAM). В качестве альтернативы, белок Cas согласно данному документу может не обладать активностью расщепления или внесения однонитевого разрыва ДНК, но может продолжать специфически связываться с целевой последовательностью ДНК, находясь в комплексе с подходящим РНК-компонентом. (См. также заявку на патент США US 2015-0082478 A1 и US 2015-0059010 A1, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Комплекс направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas может расщеплять одну или обе нити целевой последовательности ДНК. Комплекс направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas, который может расщеплять обе нити целевой последовательности ДНК, как правило, содержит белок Cas, у которого все его эндонуклеазные домены находятся в функциональном состоянии (например, представляют собой эндонуклеазные домены дикого типа или их варианты, сохраняющие некоторую степень активности или полную активность каждого эндонуклеазного домена). Таким образом, белок Cas дикого типа (например, белок Cas9, раскрытый в данном документе) или его вариант, сохраняющий некоторую степень

активности или полную активность каждого эндонуклеазного домена белка Cas, представляют собой подходящий пример эндонуклеазы Cas, которая может расщеплять обе нити целевой последовательности ДНК. Белок Cas9, содержащий функциональные нуклеазные домены RuvC и HNH, представляет собой пример белка Cas, который может расщеплять обе нити целевой последовательности ДНК. Комплекс направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas, который может расщеплять одну нить целевой последовательности ДНК, может быть охарактеризован в данном документе как обладающий никазной активностью (например, способностью частичного расщепления). Никаза Cas, как правило, содержит один функциональный эндонуклеазный домен, который позволяет Cas расщепить только одну нить (т. е. сделать односторонний разрыв) целевой последовательности ДНК. Например, никаза Cas9 может содержать (i) мутантный, дисфункциональный домен RuvC и (ii) функциональный домен HNH (например, домен HNH дикого типа). В качестве другого примера никаза Cas9 может содержать (i) функциональный домен RuvC (например, домен RuvC дикого типа) и (ii) мутантный, дисфункциональный домен HNH. Неограничивающие примеры никаз Cas9, подходящих для применения в данном документе, раскрыты в публикации заявки на патент США № 2014/0189896, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Можно применять пару никаз Cas9 для повышения специфичности нацеливания на ДНК. В целом, это можно осуществлять путем обеспечения двух никаз Cas9, которые за счет того, что они ассоциированы с РНК-компонентами с различными направляющими последовательностями, нацеливаются и образуют односторонний разрыв в близлежащих последовательностях ДНК на противоположных нитях в участке требуемого нацеливания. Такое близкорасположенное расщепление каждой нити ДНК образует двухсторонний разрыв (т. е. DSB с односторонними выступающими концами), который затем распознается как субстрат для негомологичного соединения концов NHEJ (склонное к незавершенному восстановлению, приводящему к мутациям) или гомологичной рекомбинации HR. В данных вариантах осуществления каждый односторонний разрыв может располагаться, например, на расстоянии по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, или 100 (или любое целое число от 5 до 100) оснований друг от друга. Один или два белка никазы Cas9 согласно данному документу можно применять в паре

никазу Cas9. Например, можно применять никазу Cas9 с мутантным доменом RuvC, но функционирующим доменом HNH (т. е. Cas9 HNH+/RuvC-) (например, Cas9 HNH+/RuvC- из *Streptococcus pyogenes*). Каждая никаза Cas9 (например, Cas9 HNH+/RuvC-) будет нацелена на специфические сайты ДНК, расположенные близко друг от друга (на расстоянии до 100 пар оснований) с применением подходящих РНК-компонентов согласно данному документу с направляющими последовательностями РНК, нацеливающими каждую никазу на каждый специфический сайт ДНК.

Белок Cas может представлять собой часть слитого белка, содержащего один или несколько гетерологичных белковых доменов (например, 1, 2, 3 или более доменов в дополнение к белку Cas). Такой слитый белок может содержать любую дополнительную белковую последовательность и необязательно линкерную последовательность между любыми двумя доменами, как например, между Cas и первым гетерологичным доменом. Примеры белковых доменов, которые могут быть слиты с белком Cas согласно данному документу, включают без ограничений эпитопные метки (например, гистидин [His], V5, FLAG, гемагглютинин вируса гриппа [HA], мус, VSV-G, тиоредоксин [Trx]), репортеры (например, глутатион-S-трансферазу [GST], пероксидазу хрена [HRP], хлорамфеникол-ацетилтрансферазу [CAT], бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу [GUS], люциферазу, зеленый флуоресцентный белок [GFP], HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок [CFP], желтый флуоресцентный белок [YFP], синий флуоресцентный белок [BFP]) и домены, обладающие одной или несколькими из следующих активностей: метилазная активность, деметилазная активность, активность активации транскрипции (например, VP16 или VP64), активность подавления транскрипции, активность фактора терминации транскрипции, активность модификации гистонов, активность расщепления РНК и активность связывания нуклеиновых кислот. Белок Cas также может быть слит с белком, который связывает молекулы ДНК или другие молекулы, таким как белок связывания мальтозы (MBP), S-tag, ДНК-связывающий домен (DBD) Lex A, ДНК-связывающий домен GAL4A и VP16 вируса простого герпеса (HSV). См. заявки на патент согласно РСТ РСТ/US16/32073, поданную 12 мая 2016 г., и РСТ/US16/32028, поданную 12 мая 2016 г. (обе заявки включены в данный документ посредством ссылки), для получения дополнительных примеров белков Cas.

В определенных вариантах осуществления комплекс



направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas может связываться с последовательностью целевого сайта ДНК, но не расщепляет ни одну нить в последовательности целевого сайта. Такой комплекс может содержать белок Cas, в котором все его нуклеазные домены являются мутантными, дисфункциональными. Например, в данном документе белок Cas9, который может связываться с последовательностью целевого сайта ДНК, но не расщепляет ни одну нить в последовательности целевого сайта, может содержать как мутантный, дисфункциональный домен RuvC, так и мутантный, дисфункциональный домен HNH. Белок Cas согласно данному документу, который связывает, но не расщепляет целевую последовательность ДНК, можно применять для модуляции экспрессии гена, например, в этом случае белок Cas можно сливать с фактором транскрипции (или его частью) (например, репрессором или активатором, таким как любой из раскрытых в данном документе). В других аспектах инактивированный белок Cas может быть слит с другим белком, обладающим эндонуклеазной активностью, таким как эндонуклеаза Fok I.

Ген эндонуклеазы Cas в данном документе может кодировать эндонуклеазу Cas9 типа II, такой как без ограничения гены Cas9, перечисленные в SEQ ID NOs: 462, 474, 489, 494, 499, 505, и 518WO2007/025097 и включенные в данный документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления ген эндонуклеазы Cas представляет собой микробный или оптимизированный ген эндонуклеазы Cas9. Ген эндонуклеазы Cas может быть функционально связан с сигналом внутриядерного нацеливания SV40 выше от участка кодона Cas и двусоставным сигналом внутриядерной локализации VirD2 (Tinland et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7442-6) ниже участка кодона Cas.

Другие эндонуклеазные системы Cas были описаны в заявках на патент согласно PCT PCT/US16/32073 и PCT/US16/32028, обе заявки включены в данный документ посредством ссылки.

"Cas9" (ранее называемая как Cas5, Csn1 или Csx12) согласно данному документу относится к эндонуклеазе Cas из системы CRISPR типа II, которая образует комплекс с crNucleotide и tracrNucleotide или с направляющим полинуклеотидом для специфического распознавания и расщепления всей или части целевой последовательности ДНК. Белок Cas9 содержит домен нуклеазы RuvC и домен нуклеазы HNH (H-N-H), каждый из которых может расщеплять одну нить ДНК в целевой последовательности

(согласованное действие обоих доменов приводит к двухнитевому расщеплению ДНК, тогда как активность одного домена приводит к однонитевому разрыву). В целом, домен RuvC содержит субдомены I, II и III, при этом домен I расположен возле N-конца Cas9, а субдомены II и III расположены в средней части белка, фланкируя HNH-домен (Hsu et al, Cell 157:1262-1278). Система CRISPR типа II включает систему расщепления ДНК, использующую эндонуклеазу Cas9 в комплексе с по меньшей мере одним полинуклеотидным компонентом. Например, Cas9 может находиться в комплексе с РНК CRISPR (crRNA) и транскрибирующей РНК CRISPR (tracrRNA). В другом примере Cas9 может находиться в комплексе с одиночной направляющей РНК.

Белок Cas согласно данному документу, такой как Cas9, может содержать гетерологичную последовательность ядерной локализации (NLS). Гетерологичная аминокислотная последовательность NLS согласно данному документу может характеризоваться достаточной эффективностью, например, чтобы привести к накоплению белка Cas в обнаруживаемом количестве в ядре дрожжевой клетки согласно данному документу. NLS содержит одну (одинарный) или несколько (например, двойной) коротких последовательностей (например, имеющих от 2 до 20 остатков) из основных, положительно заряженных остатков (например, лизина и/или аргинина) и может быть расположен в любом месте аминокислотной последовательности Cas, но так, чтобы он располагался на поверхности белка. NLS может быть функционально связан, например, с N-концом или C-концом белка Cas согласно данному документу. С белком Cas могут быть связаны две или более последовательности NLS, например, такие как на обоих N- и C-концах белка Cas. Неограничивающие примеры подходящих последовательностей NLS включают раскрытые в патенте США № 7309576, который включен в данный документ посредством ссылки.

Эндонуклеаза Cas может содержать модифицированную форму полипептида Cas9. Модифицированная форма полипептида Cas9 может включать изменение аминокислоты (например, делецию, вставку или замену), которое снижает природную нуклеазную активность белка Cas9. Например, в некоторых случаях модифицированная форма белка Cas9 имеет менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% нуклеазной активности соответствующего полипептида Cas9 дикого типа (заявка на патент США US20140068797 A1). В некоторых случаях модифицированная

форма полипептида Cas9 не обладает достаточной нуклеазной активностью и называется каталитически "инактивированным Cas9" или "дезактивированным cas9 (dCas9)". Каталитически инактивированные варианты Cas9 включают варианты Cas9, которые содержат мутации в нуклеазных доменах HNH и RuvC. Такие каталитически инактивированные варианты Cas9 способны взаимодействовать с sgRNA и связываться с целевым сайтом *in vivo*, но не могут расщеплять ни одну из нитей целевой ДНК.

Каталитически неактивный Cas9 может быть слит с гетерологичной последовательностью (заявка на патент США US20140068797 A1). Подходящие партнеры по слиянию включают без ограничения полипептид, который обеспечивает активность, которая опосредованно увеличивает транскрипцию, воздействуя непосредственно на целевую ДНК или на полипептид (например, гистон или другой ДНК-связывающий белок), связанный с целевой ДНК. Дополнительные подходящие партнеры по слиянию включают без ограничения полипептид, который обеспечивает метилтрансферазную активность, деметилазную активность, ацетилтрансферазную активность, деацетилазную активность, киназную активность, фосфатазную активность, убиквитинлигазную активность, активность деубиквитинирования, активность аденилирования, активность деаденилирования, активность сумоилирования, активность десумоилирования, активность рибозилирования, активность дерибозилирования, активность миристоилирования или активность демиристоилирования. Другие подходящие партнеры по слиянию включают без ограничения полипептид, который непосредственно обеспечивает повышенную транскрипцию целевой нуклеиновой кислоты (например, активатор транскрипции или его фрагмент, белок или его фрагмент, который рекрутирует активатора транскрипции, низкомолекулярный/чувствительный к лекарственным средствам регулятор транскрипции и т. д.). Каталитически неактивный Cas9 также может быть слит с нуклеазой FokI для образования двухнитевых разрывов (Guilinger et al. *Nature Biotechnology*, том 32, номер 6, июнь 2014 г.).

Термины "функциональный фрагмент", "фрагмент, который является функционально эквивалентным" и "функционально эквивалентный фрагмент" эндонуклеазы Cas используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к части или подпоследовательности последовательности эндонуклеазы Cas по настоящему изобретению, в которой сохраняется способность

распознавать, связывать и необязательно разрезать или расщеплять (вводить одно- или двухнитевый разрыв) целевой сайт.

Термины "функциональный вариант", "вариант, который является функционально эквивалентным" и "функционально эквивалентный вариант" эндонуклеазы Cas используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к варианту эндонуклеазы Cas по настоящему изобретению, в котором сохраняется способность распознавать, связывать и необязательно разрезать или расщеплять (вводить одно- или двухнитевый разрыв) целевой сайт. Фрагменты и варианты можно получать с помощью способов, таких как сайт-направленный мутагенез и конструирование синтетических последовательностей.

В способах, раскрытых в данном документе, может применяться любая направляемая эндонуклеаза. Такие эндонуклеазы включают без ограничений эндонуклеазы Cas9 и Cpf1. До настоящего времени было описано много эндонуклеаз, которые могут распознавать специфические последовательности PAM (см., например, Jinek et al. (2012) *Science* 337 p 816-821, заявки на патент согласно PCT PCT/US16/32073 и PCT/US16/32028 и Zetsche B et al. 2015. *Cell* 163, 1013) и расщеплять целевую ДНК в определенных положениях. Понятно, что на основании способов и вариантов осуществления, описанных в данном документе, в которых используется система направляемой Cas, в данной ситуации можно приспособить эти способы, чтобы в них использовалась любая система направляемой эндонуклеазы.

Используемый в данном документе термин "направляющий полинуклеотид" относится к полинуклеотидной последовательности, которая может образовывать комплекс с эндонуклеазой Cas и обеспечивает способность эндонуклеазы Cas распознавать, связываться и необязательно расщеплять целевой сайт ДНК. Направляющий полинуклеотид может представлять собой одиночную молекулу или димерную молекулу. Направляющая полинуклеотидная последовательность может представлять собой последовательность РНК, последовательность ДНК или их комбинацию (комбинированная последовательность ДНК-РНК). Необязательно направляющий полинуклеотид может содержать по меньшей мере один нуклеотид, фосфодиэфирную связь или модификацию связи, такую как без ограничения закрытая нуклеиновая кислота (LNA), 5-метил-dC, 2,6-диаминопурин, 2'-фтор-А, 2'-фтор-У, 2'-О-метил-РНК, тиофосфатную связь, связь с молекулой холестерина, связь с молекулой

полиэтиленгликоля, связь с молекулой спейсера 18 (цепь гексаэтиленгликоля) или 5'-3'-ковалентную связь, приводящую к циркуляризации. Направляющий полинуклеотид, который содержит только рибонуклеиновые кислоты, также упоминается как "направляющая РНК" или "gRNA" (см. также заявку на патент США US 2015-0082478 A1 и US 2015-0059010 A1, обе из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки).

Направляющий полинуклеотид может представлять собой димерную молекулу (также называемую дуплексным направляющим полинуклеотидом), содержащую последовательность crNucleotide и последовательность tracrNucleotide. CrNucleotide включает первый домен нуклеотидной последовательности (называемый варибельным целевым доменом или доменом VT), который может гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью в целевой ДНК, и вторую нуклеотидную последовательность (также называемую парной последовательностью для tracr), которая является частью домена распознавания эндонуклеазы (CER). Парная последовательность для tracr может гибридизоваться с tracrNucleotide вдоль участка комплементарности и вместе образовывать домен распознавания эндонуклеазы Cas или домен CER. Домен CER способен взаимодействовать с полипептидом эндонуклеазы Cas. CrNucleotide и tracrNucleotide дуплексного направляющего полинуклеотида могут представлять собой комбинированные последовательности РНК, ДНК и/или РНК-ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекулу crNucleotide дуплексного направляющего полинуклеотида называют "crDNA" (когда она состоит из непрерывного отрезка из ДНК-нуклеотидов), или "crRNA" (когда она состоит из непрерывного отрезка из РНК-нуклеотидов), или "crDNA-RNA" (когда она состоит из комбинации ДНК- и РНК-нуклеотидов). Cr-нуклеотид может содержать фрагмент crRNA, встречающийся в природе у Bacteria и Archaea. Размер фрагмента crRNA, встречающегося в природе у Bacteria и Archaea, который может присутствовать в crNucleotide, раскрытом в данном документе, может варьировать без ограничения в диапазоне 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления tracrNucleotide называют "tracrRNA" (если она состоит из непрерывного отрезка из РНК-нуклеотидов), или "tracrDNA" (если она состоит из непрерывного отрезка из ДНК-нуклеотидов), или "tracrDNA-RNA" (если она состоит из комбинации ДНК- и РНК-нуклеотидов). В одном варианте осуществления РНК,

которая направляет комплекс РНК/эндонуклеаза Cas9, представляет собой дуплексную РНК, содержащую дуплекс crRNA-tracrRNA.

tracrRNA (транс-активирующая РНК CRISPR) содержит в направлении 5'-3' (i) последовательность, которая подвергается отжигу с повторяющимся участком CRRPR типа II crRNA и (ii) часть, содержащую структуру стебель-петля (Deltcheva et al., Nature 471: 602-607). Дуплексный направляющий полинуклеотид может образовывать комплекс с эндонуклеазой Cas, где указанный комплекс полинуклеотид/эндонуклеаза Cas (также называемый системой направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas) может направлять эндонуклеазу Cas в геномный целевой сайт, обеспечивая распознавание, связывание и необязательно разрезание или расщепление (введение однонитевого или двухнитевого разрыва) целевого сайта эндонуклеазой Cas. (См. также заявку на патент США US 2015-0082478 A1, опубликованную 19 марта 2015 г., и US 2015-0059010 A1, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Одиночный направляющий полинуклеотид может образовывать комплекс с эндонуклеазой Cas, где указанный комплекс полинуклеотид/эндонуклеаза Cas (также называемый системой направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas) может направлять эндонуклеазу Cas в геномный целевой сайт, обеспечивая распознавание, связывание и необязательно разрезание или расщепление (введение однонитевого или двухнитевого разрыва) целевого сайта эндонуклеазой Cas. (См. также заявку на патент США US 2015-0082478 A1 и US 2015-0059010 A1, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.)

Термины "вариабельный нацеливающий домен" или "VT-домен" используются в данном документе взаимозаменяемо и включают нуклеотидную последовательность, которая может гибридизоваться (является комплементарной) с одной нитью (нуклеотидной последовательностью) целевого сайта двухнитевой ДНК. Процент комплементарности между первым доменом нуклеотидной последовательности (VT-доменом) и целевой последовательностью может составлять по меньшей мере 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 63%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Вариабельный нацеливающий

домен может составлять по меньшей мере 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления переменный нацеливающий домен содержит непрерывный отрезок из 12-30 нуклеотидов. Переменный нацеливающий домен может состоять из последовательности ДНК, последовательности РНК, модифицированной последовательности ДНК, модифицированной последовательности РНК или любой их комбинации.

Термины "домен распознавания эндонуклеазы Cas" или "CER-домен" (направляющего полинуклеотида) используются в данном документе взаимозаменяемо и включают нуклеотидную последовательность, которая взаимодействует с полипептидом эндонуклеазы Cas. CER-домен содержит парную последовательность для tracrNucleotide, за которой следует последовательность tracrNucleotide. CER-домен может состоять из последовательности ДНК, последовательности РНК, модифицированной последовательности ДНК, модифицированной последовательности РНК (см., например, US 2015-0059010 A1, включенный в данный документ по всей своей полноте посредством ссылки) или любой их комбинации.

Термины "функциональный фрагмент", "фрагмент, который является функционально эквивалентным" и "функционально эквивалентный фрагмент" направляющей РНК, crRNA или tracrRNA используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к части или подпоследовательности направляющей РНК, crRNA или tracrRNA соответственно по настоящему изобретению, при этом способность функционировать как направляющая РНК, crRNA или tracrRNA, соответственно, сохраняется.

Термины "функциональный вариант", "вариант, который является функционально эквивалентным" и "функционально эквивалентный вариант" направляющей РНК, crRNA или tracrRNA используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к варианту направляющей РНК, crRNA или tracrRNA соответственно по настоящему изобретению, при этом способность функционировать как направляющая РНК, crRNA или tracrRNA, соответственно, сохраняется.

Термины "одиночная направляющая РНК" и "sgRNA" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к синтетическому слиянию двух молекул РНК, crRNA (CRISPR РНК), содержащей переменный нацеливающий домен (связанный с парной последовательностью для tracr, которая гибридизуется с

tracrRNA), слитый с tracrRNA (транс-активирующая РНК CRISPR). Одиночная направляющий РНК может содержать crRNA или фрагмент crRNA и tracrRNA или фрагмент tracrRNA системы CRISPR/Cas II типа, которые могут образовать комплекс с эндонуклеазой Cas II типа, где указанный комплекс направляющая РНК/эндонуклеаза Cas может направлять эндонуклеазу Cas к целевому сайту ДНК, обеспечивая распознавание, связывание и необязательно разрезание или расщепление (введение однонитевого или двухнитевого разрыва) целевого сайта ДНК эндонуклеазой Cas.

Термины "комплекс направляющая РНК/эндонуклеаза Cas", "система направляющая РНК/эндонуклеаза Cas", "комплекс направляющая РНК/Cas", "система gRNA/Cas", "РНК-направленная эндонуклеаза" используются взаимозаменяемо в данном документе и относятся по меньшей мере к одному РНК-компоненту, и по меньшей мере к одной эндонуклеазе Cas, которые способны образовывать комплекс, где указанный комплекс направляющая РНК/эндонуклеаза Cas может направлять эндонуклеазу Cas в целевой сайт ДНК, обеспечивая распознавание, связывание и необязательно разрезание или расщепление (введение однонитевого или двухнитевого разрыва) целевого сайта ДНК эндонуклеазой Cas. Комплекс направляющая РНК/эндонуклеаза Cas в данном документе может содержать белок(белки) Cas и подходящий(подходящие) РНК-компонент(компоненты) любой из четырех известных систем CRISPR (Horvath and Barrangou, 2010, *Science* 327: 167-170), таких как система CRISPR типа I, II или III. Комплекс направляющая РНК/эндонуклеаза Cas может содержать эндонуклеазу Cas9 типа II и по меньшей мере один РНК-компонент (например, crRNA и tracrRNA или gRNA). (См. также заявку на патент США US 2015-0082478 A1 и US 2015-0059010 A1, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Направляющий полинуклеотид может быть временно введен в клетку в виде однонитевого полинуклеотида или двухнитевого полинуклеотида с применением любого способа, известного из уровня техники, такого как без ограничения бомбардировка частицами, трансформация *Agrobacterium* или местные применения. Направляющий полинуклеотид также может быть введен опосредованно в клетку путем введения рекомбинантной молекулы ДНК (с помощью таких способов, как без ограничения бомбардировка частицами или трансформация *Agrobacterium*), содержащей фрагмент гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей направляющий полинуклеотид,



функционально связанный со специфическим промотором, который способен транскрибировать направляющую РНК в указанной клетке. Специфический промотор может представлять собой без ограничения промотор РНК-полимеразы III, который обеспечивает транскрипцию РНК с точно определенными немодифицированными 5'- и 3'-концами (DiCarlo et al., *Nucleic Acids Res.* 41: 4336-4343; Ma et al., *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3:e161), как описано в WO2016025131, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Термины "целевой сайт", "целевая последовательность", "последовательность целевого сайта", "целевая ДНК", "целевой локус", "геномный целевой сайт", "геномная целевая последовательность", "геномный целевой локус" и "протоспейсер" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полинуклеотидной последовательности, в том числе без ограничения нуклеотидной последовательности в хромосоме, эписоме или любой другой молекуле ДНК в геноме (включая хромосомную, хлоропластическую, митохондриальную ДНК, плазмидную ДНК) клетки, в которой комплекс направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas может распознавать, связывать и необязательно разрезать или расщеплять. Целевой сайт может быть эндогенным сайтом в геноме клетки, или, в качестве альтернативы, целевой сайт может быть гетерологичным по отношению к клетке и, таким образом, не встречаться в природе в геноме клетки, или целевой сайт может находиться в гетерологичном местоположении в геноме по сравнению с тем, в котором он встречается в природе. Используемые в данном документе термины "эндогенная целевая последовательность" и "нативная целевая последовательность" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения целевой последовательности, которая является эндогенной или нативной для генома клетки. Клетки включают без ограничения клетки человека, клетки, отличные от человеческих, клетки животных, бактерий, грибов, насекомых, дрожжей, нетрадиционных видов дрожжей и растительные клетки, а также растения и семена, полученные с помощью способов, описанных в данном документе. Термины "искусственный целевой сайт" или "искусственная целевая последовательность" применяются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к целевой последовательности, которая была введена в геном клетки. Такая искусственная целевая последовательность может быть идентичной по последовательности

по отношению к эндогенной или нативной целевой последовательности в геноме клетки, но локализована в другом положении (т. е. неэндогенном или ненативном положении) в геноме клетки.

Термины "измененный целевой сайт", "измененная целевая последовательность", "модифицированный целевой сайт", "модифицированная целевая последовательность" применяются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к целевой последовательности, раскрываемой в данном документе, которая содержит по меньшей мере одно изменение по сравнению с неизменной целевой последовательностью. Такие "изменения" предусматривают, например, (i) замещение по меньшей мере одного нуклеотида, (ii) делецию по меньшей мере одного нуклеотида, (iii) вставку по меньшей мере одного нуклеотида или (iv) любую комбинацию из (i)-(iii).

Длина последовательности целевой ДНК (целевого сайта) может варьироваться и включает, например, целевые сайты, длина которых составляет по меньшей мере 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более нуклеотидов. Кроме того, возможно, что целевой сайт может быть палиндромным, то есть последовательность одной нити читается точно так же в обратном направлении на комплементарной нити. Сайт однонитевого разрыва/расщепления может находиться в пределах целевой последовательности, или сайт однонитевого разрыва/расщепления может находиться за пределами целевой последовательности. В другом варианте расщепление может происходить в положениях нуклеотидов непосредственно напротив друг друга с получением разреза с тупыми концами, или, в других случаях, разрезы могут быть несимметрично расположенными с получением однонитевых выступающих концов, также называемых "липкими концами", которые могут быть 5'-липкими концами или 3'-липкими концами. Также можно использовать активные варианты геномных целевых сайтов. Такие активные варианты могут содержать последовательность, идентичную на по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше данному целевому сайту, при этом активные варианты сохраняют биологическую активность и, следовательно, способны распознаваться и расщепляться эндонуклеазой Cas. Анализы для измерения однонитевого или двухнитевого разрыва целевого сайта эндонуклеазой известны из уровня техники и обычно измеряют общую

активность и специфичность средства на ДНК-субстратах, содержащих сайты распознавания.

"Прилегающий к протоспейсеру мотив" (РАМ) в данном документе относится к короткой нуклеотидной последовательности, прилегающей к целевой последовательности (протоспейсеру), которая распознается (нацеливается) системой направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas, описанной в данном документе. Эндонуклеаза Cas может не распознавать успешно последовательность целевой ДНК, если за последовательностью целевой ДНК не следует последовательность РАМ. Последовательность и длина РАМ согласно данному документу могут отличаться в зависимости от применяемого белка Cas или комплекса белка Cas. Последовательность РАМ может быть любой длины, но обычно составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов в длину.

Термины "нацеливание", "нацеливание на гены" и "нацеливание на ДНК" используются в данном документе взаимозаменяемо. Нацеливание на ДНК согласно данному документу может представлять собой специфическое введение нокаута, редактирования или нокина в определенную последовательность ДНК, расположенную в хромосоме или плазмиде клетки. В целом, нацеливание на ДНК согласно данному документу может осуществляться путем расщепления одной или обеих нитей в специфической последовательности ДНК в клетке с помощью эндонуклеазы, ассоциированной с подходящим полинуклеотидным компонентом. Такое расщепление ДНК, в случае двухнитевого разрыва (DSB), может стимулировать процессы NHEJ или HDR, которые могут приводить к модификациям в целевом сайте.

Способ нацеливания согласно данному документу можно осуществлять таким образом, что в способе подвергаются нацеливанию, например, два или более целевых сайтов ДНК. Такой способ необязательно может быть охарактеризован как мультиплексный способ. В определенных вариантах осуществления нацеливанию в одно и то же время могут подвергаться два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более целевых сайтов. Мультиплексный способ, как правило, выполняют с помощью способа нацеливания согласно данному документу, в котором обеспечено множество различных РНК-компонентов, при этом каждый сконструирован для направления комплекса направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas на уникальный целевой сайт ДНК.

Термины "нокаут", "нокаут гена" и "генный нокаут"

используются в данном документе взаимозаменяемо. Нокауту согласно данному документу соответствует последовательность ДНК в клетке, которая стала частично или полностью неработоспособной из-за нацеливания белка Cas; причем такая последовательность ДНК до нокаута, например, могла кодировать аминокислотную последовательность или могла обладать регуляторной функцией (например, промоторной). Нокаут может быть произведен путем вставки/делеции (вставки или делеции нуклеотидных оснований в последовательности целевой ДНК за счет NHEJ) или путем специфического удаления последовательности, которая уменьшает или полностью разрушает функцию последовательности в или вблизи целевого сайта.

Система направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas может использоваться в комбинации с совместно доставляемой матрицей для модификации полинуклеотида, чтобы обеспечить редактирование (модификацию) геномной нуклеотидной последовательности, представляющей интерес. (См. также заявку на патент США US 2015-0082478 A1 и WO2015/026886 A1, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Термины "нокин", "нокин гена", "генная вставка" и "генный нокин" используются в данном документе взаимозаменяемо. Нокину соответствует замещение или вставка последовательности ДНК в специфическую последовательность ДНК в клетке путем нацеливания с помощью белка Cas (путем HR, где также применяется подходящий донорный полинуклеотид ДНК). Примеры нокинов включают без ограничения специфическую вставку гетерологичной последовательности, кодирующей аминокислоту, в кодирующий участок гена или специфическую вставку элемента регуляции транскрипции в локус гена.

Различные способы и композиции можно использовать для получения клетки или организма, имеющих полинуклеотид, представляющий интерес, вставленный в целевой сайт для эндонуклеазы Cas. В таких способах можно использовать гомологичную рекомбинацию для обеспечения интеграции полинуклеотида, представляющего интерес, в целевой сайт. В одном из предложенных способов полинуклеотид, представляющий интерес, предоставляется клетке организма в донорной ДНК-конструкции. Используемый в данном документе термин "донорная ДНК" представляет собой ДНК-конструкцию, которая содержит полинуклеотид, представляющий интерес, подлежащий вставке в

целевой сайт эндонуклеазы Cas. Донорная ДНК-конструкция может дополнительно содержать первый и второй участки гомологии, которые фланкируют полинуклеотид, представляющий интерес. Первый и второй участки гомологии донорной ДНК обладают гомологией по отношению к первому и второму участкам генома, соответственно, присутствующим в целевом сайте клетки или организма или фланкирующим его. Под "гомологией" подразумеваются последовательности ДНК, которые являются подобными. Например, "участок гомологии по отношению к участку генома", который находится в донорной ДНК, представляет собой участок ДНК, который имеет последовательность, подобную данному "участку генома" в клетке или геноме организма. Участок гомологии может иметь любую длину, которая достаточна для обеспечения гомологичной рекомбинации в расщепленном целевом сайте. Например, участок гомологии может содержать по меньшей мере 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45, 5-50, 5-55, 5-60, 5-65, 5-70, 5-75, 5-80, 5-85, 5-90, 5-95, 5-100, 5-200, 5-300, 5-400, 5-500, 5-600, 5-700, 5-800, 5-900, 5-1000, 5-1100, 5-1200, 5-1300, 5-1400, 5-1500, 5-1600, 5-1700, 5-1800, 5-1900, 5-2000, 5-2100, 5-2200, 5-2300, 5-2400, 5-2500, 5-2600, 5-2700, 5-2800, 5-2900, 5-3000, 5-3100 или более оснований в длину, так что участок гомологии обладает достаточной гомологией, чтобы подвергаться гомологичной рекомбинации с соответствующим участком генома. "Достаточная гомология" указывает на то, что две последовательности полинуклеотидов имеют достаточное структурное сходство, чтобы выступать в качестве субстратов для реакции гомологичной рекомбинации. Структурное сходство включает общую длину каждого фрагмента полинуклеотида, а также сходство последовательности полинуклеотидов. Сходство последовательностей может быть описано с помощью процентной идентичности последовательностей по всей длине последовательностей, и/или с помощью консервативных участков, содержащих локализованные сходства, такие как смежные нуклеотиды, характеризующиеся 100% идентичностью последовательностей, и процентной идентичностью последовательностей в части длины последовательностей.

"Процентная (%) идентичность последовательности" относительно контрольной последовательности (рассматриваемой) определяется как процентная доля аминокислотных остатков или нуклеотидов в кандидатной последовательности (запрашиваемой), которые идентичны соответствующим аминокислотным остаткам или

нуклеотидам в контрольной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности и без учета каких-либо аминокислотных консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процентной идентичности последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в данной области техники, например с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2. Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, в том числе любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Для определения процентной идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты осуществляют выравнивание последовательностей для целей оптимального сравнения. Процентная идентичность двух последовательностей является функцией количества идентичных положений, имеющих в обеих последовательностях (например, процентная идентичность запрашиваемой последовательности=количество идентичных положений между запрашиваемой последовательностью и рассматриваемой последовательностью/общее количество положений в запрашиваемой последовательности (например, перекрывающиеся положения) $\times 100$ ).

Величина гомологии или идентичности последовательностей, разделенной целевым и донорным полинуклеотидом, может варьировать и включает общие длины и/или участки, характеризующиеся целыми единицами измерения в диапазонах приблизительно 1-20 п. о., 20-50 п. о., 50-100 п. о., 75-150 п. о., 100-250 п. о., 150-300 п. о., 200-400 п. о., 250-500 п. о., 300-600 п. о., 350-750 п. о., 400-800 п. о., 450-900 п. о., 500-1000 п. о., 600-1250 п. о., 700-1500 п. о., 800-1750 п. о., 900-2000 п. о., 1-2,5 т. о., 1,5-3 т. о., 2-4 т. о., 2,5-5 т. о., 3-6 т. о., 3,5-7 т. о., 4-8 т. о., 5-10 т. о., или до и включая общую длину целевого сайта. Такие диапазоны включают каждое целое число в пределах диапазона, например, диапазон 1-20 п. о. включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20 п. о. Величина гомологии также может быть описана процентной идентичностью последовательности по всей выровненной длине двух полинуклеотидов, которая включает

процентную идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Достаточная гомология включает любую комбинацию длины полинуклеотида, общий процент идентичности последовательности, и необязательно консервативных участков смежных нуклеотидов или локальный процент идентичности последовательности, например достаточную гомологию можно описать как область из 75-150 п.о., имеющую по крайней мере 80% идентичность последовательности с участком целевого локуса. Достаточная гомология может также быть описана с помощью предсказанной способности двух полинуклеотидов к специфической гибридизации в условиях высокой жесткости, смотрите, например, Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Eds (1994) *Current Protocols* (Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.); и Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes* (Elsevier, New York).

Структурное подобие между данным участком генома и соответствующим участком гомологии, находящимся в донорной ДНК, может представлять любую степень идентичности последовательностей, которая обеспечивает возникновение гомологичной рекомбинации. Например, величина гомологии или идентичности последовательности, разделяемая "участком гомологии" донорной ДНК и "геномным участком" генома организма, может представлять собой по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности, так что последовательности подвергаются гомологичной рекомбинации

Участок гомологии в донорной ДНК может обладать гомологией с любой последовательностью, фланкирующей целевой сайт. Тогда как в некоторых вариантах осуществления участки гомологии обладают значительной гомологией последовательности по отношению к геномной последовательности, непосредственно фланкирующей целевой сайт, при этом следует учитывать, что участки гомологии могут быть разработаны с обеспечением достаточной гомологии по

отношению к участкам, которые, кроме того, могут быть расположены 5'- или 3'- по отношению к целевому сайту. В еще других вариантах осуществления участки гомологии также могут обладать гомологией с фрагментом целевого сайта вместе с нижележащими участками генома. В одном варианте осуществления первый участок гомологии дополнительно содержит первый фрагмент целевого сайта, а второй участок гомологии содержит второй фрагмент целевого сайта, где первый и второй фрагменты отличаются.

Термин "гомологичная рекомбинация", используемый в данном документе, включает обмен фрагментами ДНК между двумя молекулами ДНК на сайтах гомологии. На частоту гомологичной рекомбинации влияет ряд факторов. Различные организмы отличаются в отношении величины гомологичной рекомбинации и относительного соотношения гомологичной и негомологичной рекомбинации. Как правило, длина участка гомологии влияет на частоту событий гомологичной рекомбинации, чем длиннее участок гомологии, тем больше частота. Длина участка гомологии, необходимая для наблюдения гомологичной рекомбинации, также изменяется в зависимости от вида. Во многих случаях применялась гомология по меньшей мере 5 т. о., но гомологичная рекомбинация наблюдалась при гомологии всего лишь 25-50 п. о. См., например, Singer et al. (1982) *Cell* 31:25-33; Shen and Huang (1986) *Genetics* 112:441-57; Watt et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4768-72, Sugawara and Haber (1992) *Mol Cell Biol* 12:563-75, Rubnitz and Subramani (1984) *Mol Cell Biol* 4:2253-8; Ayares et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5199-203; Liskay et al. (1987) *Genetics* 115:161-7.

Репарация, направляемая гомологией (HDR), представляет собой механизм в клетках для репарации двухнитевых и однонитевых разрывов ДНК. Репарация, направляемая гомологией, включает гомологичную рекомбинацию (HR) и однонитевой отжиг (SSA) (Lieber. 2010 *Annu. Rev. Biochem.* 79:181-211). Наиболее распространенная форма HDR называется гомологичной рекомбинацией (HR), которая имеет требования в отношении самой длинной гомологии последовательности между донорной и акцепторной ДНК. Другие формы HDR включают однонитевой отжиг (SSA) и репликацию, индуцированную разрывом, и они требуют более короткой гомологии последовательности по сравнению с HR. Репарация, направляемая гомологией, ников (одноцепочечные разрывы) может происходить с помощью механизма, отличного от HDR при двухнитевых разрывах



(Davis и Maizels. (2014) PNAS (0027-8424), 111 (10), p. E924-E932).

Перестройка генома растительной клетки, например, посредством гомологичной рекомбинации (HR), является мощным инструментом для геной инженерии. Гомологичная рекомбинация была продемонстрирована на растениях (Halfter et al. (1992) *Mol Gen Genet* 231: 186-93) и насекомых (Dray and Gloor, 1997, *Genetics* 147: 689-99). Гомологичную рекомбинацию также осуществляли в других организмах. Например, по меньшей мере 150-200 п. о. гомологии было необходимо для гомологичной рекомбинации в паразитическом простейшем *Leishmania* (Papadopoulou and Dumas, (1997) *Nucleic Acids Res* 25:4278-86). В мицелиарном грибе *Aspergillus nidulans*, замена гена была выполнена с помощью всего 50 п. о. фланкирующей гомологии (Chaveroche et al., (2000) *Nucleic Acids Res* 28:e97). Нацеленное замещение генов также было продемонстрировано у инфузории *Tetrahymena thermophila* (Gaertig et al., (1994) *Nucleic Acids Res* 22:5391-8). У млекопитающих гомологичная рекомбинация была наиболее успешной у мышей с использованием плюрипотентных линий эмбриональных стволовых клеток (ES), которые можно выращивать в культуре, трансформировать, отбирать и вводить в эмбрион мыши (Watson et al., 1992, *Recombinant DNA*, 2nd Ed., (Scientific American Books distributed by WH Freeman & Co.).

Механизмы репарации подверженных ошибкам ДНК могут вызывать мутации в сайтах двухнитевых разрывов. Пути репарации с помощью соединения негомологичных концов (NHEJ) являются наиболее распространенными механизмами репарации для соединения разорванных концов вместе (Bleuyard, et al., (2006) *DNA Repair* 5:1-12). Структурная целостность хромосом, как правило, сохраняется при репарации, но возможны делеции, вставки или другие перестановки. Два конца одного двухнитевого разрыва являются наиболее преобладающими субстратами для NHEJ (Kirik, et al., (2000) *EMBO J* 19:5562-6), однако, если возникают два различных двухнитевых разрыва, свободные концы из разных разрывов могут связывать и образовывать в результате хромосомные делеции (Siebert and Puchta, (2002) *Plant Cell* 14:1121-31), или хромосомные транслокации между различными хромосомами (Pacher, et al., (2007) *Genetics* 175:21-9).

Донорную ДНК можно вводить с помощью любого способа, известного из уровня техники. Донорная ДНК может быть обеспечена

любым способом трансформации, известным из уровня техники, в том числе, например, опосредованной *Agrobacterium* трансформацией или бомбардировкой частицами в ходе биобаллистической трансформации. Донорная ДНК может временно присутствовать в клетке, или она может быть введена посредством вирусного репликона. При наличии эндонуклеазы Cas и целевого сайта донорную ДНК вставляют в геном трансформированного растения. (см. руководство)

Описано дальнейшее использование систем направляющая РНК/эндонуклеаза Cas (см. заявку на патент США US 2015-0082478 A1, WO2015/026886 A1, US 2015-0059010 A1, заявку США 62/023246 и заявку США 62/036652, все из которых включены в данный документ посредством ссылки), которые включают без ограничения модификацию или замену представляющих интерес нуклеотидных последовательностей (таких как регуляторные элементы), вставку представляющих интерес полинуклеотидов, нокаут гена, нокин гена, модификацию сайтов сплайсинга и/или введение альтернативных сайтов сплайсинга, модификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок, представляющий интерес, слияния аминокислот и/или белков и сайленсинг генов путем экспрессии инвертированного повтора в гене, представляющем интерес.

*II. Способы получения растений маиса с модифицированными нуклеотидными последовательностями Ht1 и/или NLB18.*

*A. Ht1*

Картирование QTL, ассоциированного с устойчивостью к северной пятнистости листьев, на хромосоме 2, описано в заявке на патент США US2010095395. Ген *Ht1* был клонирован и идентифицирован как предполагаемый ген CC-NB-LRR (суперспираль, нуклеотидсвязывающая, с богатыми лейцином повторами) ген (US 62/242691). Последовательности cDNA *Ht1* из PH4GP и PH1W2 (другого источника связанного с устойчивостью аллеля *Ht1*; заявка на патент США US2010095395) представлены под SEQ ID NO:51 и 53, соответственно, тогда как аминокислотные последовательности, кодирующие полипептиды, представлены под SEQ ID NO:52 и 54 и идентичны на 99,6%. В73 (который обладает связанным с восприимчивостью аллелем) имеет два варианта сплайсинга, и новый вариант экспрессируется на намного более высоком уровне (также называемый в данном документе В73-high), чем известный вариант (также называемый в данном документе В73-low). SEQ ID NO:55 представляет собой последовательность cDNA аллеля В73-high, тогда как аминокислотная последовательность кодируемого

полипептида представлена под SEQ ID NO:56. SEQ ID NO:57 представляет собой последовательность cDNA аллеля B73-low, тогда как аминокислотная последовательность кодируемого полипептида представлена под SEQ ID NO:58. Геномная последовательность аллеля PH4GP (устойчивого) представлена в данном документе как SEQ ID NO:59. Домены CC и NB очень похожи между связанным с восприимчивостью аллелем (B73) и связанными с устойчивостью аллелями (из PH4GP и PH1W2), как показано в US 62/242691. Тем не менее, B73 имеет делецию в LRR. Аминокислотная последовательность данного участка в связанных с устойчивостью аллелях *Ht1* представлена под SEQ ID NO:60.

Способы получения клетки растения маиса с модифицированной нуклеотидной последовательностью *Ht1* предусматривают введение двухнитевого разрыва в один или нескольких целевых сайтов в эндогенной последовательности, кодирующей *HT1*, в клетке растения маиса, и получение клетки растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *Ht1*. В одном аспекте способы предусматривают введение двухнитевого разрыва в один или нескольких целевых сайтов в эндогенной последовательности, кодирующей *Ht1*, в клетке растения маиса, и получение клетки растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *Ht1*. Способ может дополнительно предусматривать введение матрицы для замены *NLB18* в клетку растения маиса, где указанная матрица для замены *Ht1* содержит по меньшей мере одно изменение нуклеиновой кислоты по сравнению с эндогенной последовательностью, кодирующей *Ht1*, и где указанная матрица для замены *Ht1* включена в эндогенную последовательность, кодирующую *Ht1*. Способ может дополнительно предусматривать введение матрицы для замены *Ht1* в клетку растения маиса, где указанная матрица для замены *Ht1* содержит по меньшей мере одно изменение нуклеиновой кислоты по сравнению с эндогенной последовательностью, кодирующей *HT1*, и где указанная матрица для замены *Ht1* включена в эндогенную последовательность, кодирующую *HT1*. Двухцепочечный разрыв может быть индуцирован с помощью нуклеазы, в том числе без ограничения TALEN, мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами или CRISPR-ассоциированной нуклеазы. Способ может дополнительно предусматривать выращивание растения маиса из клетки растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *Ht1*, и при этом растение маиса может проявлять повышенную устойчивость к

северной пятнистости листьев.

"Нуклеотидная последовательность *Ht1*", представленная в данном документе, может относиться к промотору *Ht1*, экзонам, интронам и/или терминаторным последовательностям, как целиком, так и в виде фрагментов.

"Эндогенная последовательность, кодирующая HT1" относится к нуклеотидной последовательности, которая присутствует в немодифицированной клетке растения маиса и кодирует полипептид HT1.

"Матрица для замены *Ht1*" представляет собой матрицу для модификации полинуклеотида, содержащую благоприятную версию нуклеотидной последовательности *Ht1* (т. е. такую, которая придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев).

Растения маиса проявляют повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев по сравнению с эквивалентными растениями маиса, в которых отсутствует модифицированная нуклеотидная последовательность *Ht1*. "Эквивалент" означает, что растения маиса генетически сходны, за исключением последовательности *Ht1*.

В некоторых аспектах модифицированная нуклеотидная последовательность *Ht1* предусматривает делецию в промоторе эндогенной последовательности, кодирующей HT1. В данном случае могут предусматривать применение эндонуклеазы Cas9 и одной или нескольких направляющих РНК. Если применяют две направляющие РНК, первая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:1 [*Ht1*-TS2], а вторая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:2 [*Ht1*-TS4]; или первая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:1 [*Ht1*-TS2], а вторая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:3 [*Ht1*-ST1-TS1].

В других аспектах используют матрицу для замены *Ht1*, которая содержит нуклеотидную последовательность *Ht1* из PH4GP или ее фрагмент или нуклеотидную последовательность *Ht1*, которая при введении в клетку растения маиса кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO:52. В данном случае могут предусматривать применение эндонуклеазы Cas9 и одной или нескольких направляющих РНК. Если

применяют две направляющие РНК, первая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:14 [Ht1-TS6], а вторая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:16 [Ht1-TS9]; или первая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:15 [Ht1-TS7], а вторая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:17 [Ht1-TS10].

#### *B. NLB18*

Картирование QTL, ассоциированного с устойчивостью к северной пятнистости листьев, на хромосоме 8, описано в международной заявке на патент WO2011163590. Два протеинкиназа (PK)-подобных гена с высококонсервативными киназными каталитическими доменами были идентифицированы в непосредственной близости и упоминались в международной заявке на патент WO2011163590 как NLB17 и NLB18. *NLB18* был подтвержден как ген, обеспечивающий повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев (не опубликовано). Последовательности cDNA *NLB18* из PH26N и PH99N, двух устойчивых источников, описанных в WO2011163590, представлены под SEQ ID NO:61 и 63, соответственно, тогда как аминокислотные последовательности кодируемых полипептидов представлены под SEQ ID NO:62 и 64. SEQ ID NO:62 и SEQ ID NO:64 идентичны на 92,4%.

В данном документе предусматриваются способы получения клетки растения маиса с модифицированной нуклеотидной последовательностью *NLB18*. Способы предусматривают введение двухнитевого разрыва в один или нескольких целевых сайтов в эндогенной последовательности, кодирующей *NLB18*, в клетке растения маиса, и получение клетки растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *NLB18*. Способ может дополнительно предусматривать введение матрицы для замены *NLB18* в клетку растения маиса, где указанная матрица для замены *NLB18* содержит по меньшей мере одно изменение нуклеиновой кислоты по сравнению с эндогенной последовательностью, кодирующей *NLB18*, и где указанная матрица для замены *NLB18* включена в эндогенную последовательность, кодирующую *NLB18*. Двухнитевый разрыв может быть выполнен с помощью нуклеазы, такой как без ограничения TALEN, мегануклеаза, нуклеаза с цинковыми пальцами или нуклеаза, ассоциированная с CRISPR. Способ может

дополнительно предусматривать выращивание растения маиса из клетки растения маиса, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *NLB18*, и при этом растение маиса может проявлять повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев.

"Нуклеотидная последовательность *NLB18*", представленная в данном документе, может относиться к промотору *NLB18*, экзонам, интронам, терминаторным последовательностям и/или любой другой геномной нуклеотидной последовательности, расположенной в геномном локусе *NLB18*, как целиком, так и в виде фрагментов.

"Эндогенная последовательность, кодирующая *NLB18*" относится к нуклеотидной последовательности, которая присутствует в немодифицированной клетке растения маиса и кодирует полипептид *NLB18*.

"Матрица для замены *NLB18*" представляет собой матрицу для модификации полинуклеотида, содержащую благоприятную версию нуклеотидной последовательности *NLB18* (т. е. такую, которая придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев).

Растения маиса проявляют повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев по сравнению с эквивалентными растениями маиса, в которых отсутствует модифицированная нуклеотидная последовательность *NLB18*. "Эквивалент" означает, что растения маиса генетически сходны, за исключением последовательности *NLB18*.

В некоторых аспектах модифицированная нуклеотидная последовательность *NLB18* содержит модификацию в промоторе эндогенной последовательности, кодирующей *NLB18*.

В других аспектах используют матрицу для замены *NLB18*, которая содержит нуклеотидную последовательность *NLB18* из PH26N или PH99N или нуклеотидную последовательность *NLB18*, которая при введении в клетку растения маиса кодирует полипептид с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:64. В некоторых аспектах матрица для замены *NLB18* содержит SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления применение матрицы для замены *NLB* может включать применение эндонуклеазы Cas9 и одной или нескольких направляющих РНК. Если применяют две направляющие РНК, первая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:30 [*NLB18-TS1*], а вторая направляющая

РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:32 [NLB18-TS4]; или первая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:31 [NLB18-TS8], а вторая направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:32 [NLB18-TS4].

*III. Способы получения клеток растений маиса с геномным локусом, содержащим нуклеотидные последовательности, которые придают повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев*

Полинуклеотиды, представляющие интерес, и/или признаки могут быть объединены вместе в сложном локусе признаков, как описано в US 2013/0263324-A1 и в PCT/US13/22891, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В данном документе представлены способы получения клетки растения маиса с геномным локусом, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев. Раскрытые способы предусматривают введение двухнитевого разрыва в один или несколько целевых сайтов в геномном локусе клетки растения маиса; введение одной или нескольких нуклеотидных последовательностей, которые придают повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, где каждая нуклеотидная последовательность фланкирована 300-500 п. о. нуклеотидных последовательностей, расположенных 5' или 3' относительно соответствующих целевых сайтов; и получение клетки растения маиса, имеющей геномный локус, содержащий одну или несколько нуклеотидных последовательностей, которые придают повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев. Двухнитевый разрыв может быть индуцирован с помощью нуклеазы, такой как без ограничения TALEN, мегануклеаза, нуклеаза с цинковыми пальцами или нуклеаза, ассоциированная с CRISPR. Способ может дополнительно предусматривать выращивание растения маиса из клетки растения маиса, имеющей геномный локус, содержащий по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая обеспечивает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, и при этом растение маиса может проявлять повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев.

Растения маиса проявляют повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев по сравнению с эквивалентными растениями маиса, не имеющими нуклеотидных последовательностей, придающих

повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, в геномном локусе, представляющем интерес. "Эквивалент" означает, что растения маиса генетически сходны, за исключением геномного локуса, представляющего интерес.

В некоторых аспектах одна или несколько нуклеотидных последовательностей, которые придают повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, включают любое из следующего: *Ht1-PH4GP*, *NLB18-PH26N* и *NLB18-PH99N*. Нуклеотидная последовательность *Ht1-PH4GP* может содержать SEQ ID NO:59 или любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% SEQ ID NO:52, где полипептид придает повышенную устойчивость растению маиса к северной пятнистости листьев. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность *Ht1-PH4GP* представляет собой SEQ ID NO:65. Нуклеотидная последовательность *NLB18-PH26N* может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% SEQ ID NO:64, где полипептид придает повышенную устойчивость растению маиса к северной пятнистости листьев. В некоторых аспектах нуклеотидная последовательность *NLB18-PH26N* представляет собой SEQ ID NO:70. Нуклеотидная последовательность *NLB18-PH99N* может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% SEQ ID NO:62, где указанный полипептид придает повышенную устойчивость растению маиса к северной пятнистости листьев.

В других аспектах геномный локус, который придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, содержит STL1. В еще других аспектах нуклеотидная последовательность, кодирующая *NLB18-PH26N*, нацелена на TS8 STL1; нуклеотидная последовательность, кодирующая *NLB18-PH4GP*, нацелена на TS10 STL1; и/или нуклеотидная последовательность, кодирующая *NLB18-PH26N*, нацелена на TS45 STL1.

Описанная в данном документе система направляющий полинуклеотид/эндонуклеаза Cas9 обеспечивает эффективную систему для образования двухнитевых разрывов и позволяет укладывать



признаки в сложный локус признаков. Таким образом, в одном аспекте эндонуклеазу Cas9 используют в качестве DSB-индуцирующего средства, и одну или несколько направляющих РНК используют для нацеливания Cas9 на сайты в локусе CTL1. Одна направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:36 [CTL1-TS8]; одна направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:37 [CTL1-TS10], и одна направляющая РНК может содержать переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:38 [CTL1-TS45].

Получение растений маиса с помощью способов, описанных в данном документе, может придавать длительную устойчивость и устойчивость широкого спектра к северной пятнистости листьев и может способствовать селекции растений маиса, устойчивых к северной пятнистости листьев. Например, поскольку нуклеотидные последовательности, которые придают повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, находятся в тесной связи друг с другом (в одном локусе), это приводит к уменьшению количества определенных локусов, которые требуют интрогрессии признака с помощью возвратного скрещивания, и сведению к минимуму нежелательных сцепленных признаков от неэлитных устойчивых доноров.

Используемый в данном документе термин "гетерологичная" в отношении последовательности означает, что последовательность происходит из чужеродного вида или, если она происходит из того же вида, в существенной степени модифицирована по составу и/или местоположению в геноме по сравнению с ее нативной формой в результате преднамеренного вмешательства человека. Например, промотор, функционально связанный с гетерологичным полинуклеотидом, происходит из вида, отличного от вида, из которого получен полинуклеотид, или, если он происходит из того же/аналогичного вида, то один или оба из них являются в значительной степени модифицированными по сравнению с их исходной формой и/или местоположением в геноме, или промотор не является нативным промотором для функционально связанного полинуклеотида.

#### *IV. Клетки растений маиса, растения и семена*

"Маис" относится к растению *Zea mays* L. ssp. *mays*, который также известен как "кукуруза". Использование "ZM" перед объектом, описанным в данном документе, относится к тому факту,

что объект происходит от *Zea mays*.

Также предусмотрены растения маиса, клетки растения маиса, части растения маиса и семена, а также зерно маиса, имеющие модифицированные последовательности *Ht1* или *NLB18*, раскрытые в данном документе.

Используемый в данном документе термин растение включает растительные клетки, протопласты растений, тканевые культуры растительных клеток, из которых можно регенерировать растения, растительные каллюсы, скопления растительных клеток и растительные клетки, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как зародыши, пыльца, семязачатки, семена, листья, цветки, зерна, колоски, початки, листовые обертки, стебли, корни, кончики корней, пыльники и т. п. Предполагается, что зерно означает зрелое семя, полученное коммерческими растениеводами для целей, отличных от выращивания или воспроизводства вида.

#### *V. Направляющие полинуклеотиды*

В данном документе также предусматриваются направляющие полинуклеотиды, содержащие переменные нацеливающие домены, комплементарные целевым сайтам в эндогенной последовательности, кодирующей *Ht1*, эндогенной последовательности, кодирующей *NLB18*, или геномный локус *CTL1*. Такие направляющие полинуклеотиды могут представлять собой последовательности РНК, последовательности ДНК или комбинированные последовательности РНК-ДНК. Для *Ht1* направляющие полинуклеотиды могут иметь переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3. Для *NLB18* направляющие полинуклеотиды могут иметь переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 или SEQ ID NO:32. Для *CTL1* направляющие полинуклеотиды могут иметь переменный нацеливающий домен, комплементарный SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 или SEQ ID NO:38.

#### ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предусмотрены для иллюстрации, а не для ограничения прилагаемой формулы изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что специалисты в данной области техники поймут, что различные реагенты или параметры можно изменить без отступления от сущности настоящего изобретения или объема прилагаемой формулы изобретения.

#### ПРИМЕР 1

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНА HT1 ПОСРЕДСТВОМ УДАЛЕНИЯ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПРОМОТОРНОМ УЧАСТКЕ

Отбор целевого сайта

Сайт-направленную нуклеазную систему gRNA/Cas9, описанную в WO2015026885, WO20158026887, WO2015026883 и WO2015026886, использовали для редактирования гена *Ht1* в маисе (WO2017066597, который включен в данный документ посредством ссылки). Следующие пары целевых сайтов использовали для делеции повторяющейся последовательности в промоторной области *Ht1* PH184C (представленной посредством SEQ ID NO:71): HT1-TS2 и HT1-TS4, а также HT1-TS2 и HT1-ST1-TS1. Расположение каждого целевого сайта в геномной последовательности *Ht1* и схематическое изображение результата удаления показаны на фигуре 1, а целевые последовательности перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности промоторных участков геномных целевых сайтов *Ht1*

Обозначение целевого сайта	Последовательность геномного целевого сайта маиса	Последовательность PAM
Ht1-TS2	SEQ ID NO:1	TGG
Ht1-TS4	SEQ ID NO:2	AGG
Ht1-ST1-TS1	SEQ ID NO:3	TTAGAAA

Векторная конструкция Cas9

Ген Cas9 из *Streptococcus pyogenes* M1 GAS (SF370) (SEQ ID NO:4) оптимизировали по кодону маиса с помощью стандартных методик, известных из уровня техники, и интрон картофеля ST-LS1 вводили с целью устранения его экспрессии в *E.coli* и *Agrobacterium*. С целью облегчения ядерной локализации белка Cas9 в клетках маиса, на амино-конце открытой рамки считывания Cas9 включали одинарный амино-концевой сигнал внутриядерной локализации вируса обезьян 40 (SV40) (SEQ ID NO:5). Оптимизированный ген Cas9 маиса функционально связывали с убиквитиновым промотором маиса с помощью стандартных методик молекулярной биологии. В дополнение к амино-концевому сигналу внутриядерной локализации SV40, С-терминальный двухсоставной сигнал внутриядерной локализации эндонуклеазы VirD2 *Agrobacterium tumefaciens* сливали в конце экзона 2. Полученная последовательность представляет собой SEQ ID NO:72, включающую убиквитиновый промотор *Zea mays*, 5'-UTR гена убиквитина ZM,

интрон 1 гена убиквитина ZM, сигнал внутриядерной локализации SV40, экзон 1 Cas9 (ST1), интрон LS1 картофеля, экзон 2 Cas9 (ST1), сигнал внутриядерной локализации эндонуклеазы VirD2 и терминатор pinII.

Векторная конструкция направляющей РНК

С целью направления нуклеазы Cas9 в обозначенные геномные целевые сайты (в таблице 1), промотор U6 полимеразы III (SEQ ID NO:6; см. WO2015026885, WO20158026887, WO2015026883 и WO2015026886) и его родственные терминаторные последовательности U6 полимеразы III (TTTTTTTT) использовали для управления инициацией и терминацией экспрессии gRNA. Варибельные нацеливающие домены направляющей РНК для редактирования генов HT1 идентифицированы как HT1-CR2 и HT1-CR4, которые соответствуют геномным целевым сайтам HT1-TS2, HT1-TS4 и HT1-ST1-CR1 соответствуют HT1-ST1-TS, соответственно. ДНК, кодирующая каждый из варибельных доменов, нацеливающих нуклеотиды, была клонирована в кассету экспрессии gRNA посредством сайтов BsbI с использованием двухнитевых олиго. Каждая кассета экспрессии направляющей РНК состоит из промотора U6 полимеразы III маиса, функционально связанного с одной из ДНК-версий направляющей РНК (таблица 2), и затем родственной терминаторной последовательности U6 полимеразы III. ДНК-версия направляющей РНК состоит из соответствующего нуклеотидного варибельного нацеливающего домена, за которым следует полинуклеотидная последовательность, способная взаимодействовать с эндонуклеазой, индуцирующей двухнитевый разрыв. Кассету экспрессии направляющей РНК для HT1-ST1-CR1 встраивали в кассету экспрессии ST1 Cas9 с помощью стандартных процедур.

Таблица 2. Кассеты экспрессии направляющей РНК

Название	ДНК-версия направляющей РНК
Ht1-CR2	SEQ ID NO:7
Ht1-CR4	SEQ ID NO:8
Ht1-ST1-CR1	SEQ ID NO:9

Доставка ДНК системы направляющая РНК/эндонуклеаза Cas9 в маис

Плазмиды, содержащие кассеты экспрессии Cas9 и направляющей РНК, описанные выше, подвергали совместной бомбардировке плазмидами, содержащими селективируемый маркер трансформации NPTII и гены ODP2, контролирующие развитие, усиливающие трансформацию

(фактор транскрипции ODP2 с доменами AP2 (отвечающий за развитие семязачатка белок 2)) и Wuschel (20151030-6752 USPSP) в геномы элитных линий маиса. Трансформацию незрелых зародышей маиса можно выполнять с применением любого способа, известного из уровня техники, или способа, описанного ниже.

В одном способе трансформации початки очищали от листовой обертки, подвергали поверхностной стерилизации в 30-50% отбеливателе Clorox вместе с 0,5% моющего средства Micro в течение 10 минут и ополаскивали дважды стерильной водой. Незрелые зародыши выделяли и помещали рубчиком вниз (щитком вверх), 25 зародышей на планшет, в среду 13224E на 2-4 часа и затем выравнивали в пределах 2,5-см целевой зоны в препарате для бомбардировки.

ДНК плазмид приклеивали к 0,6 мкм (средний диаметр) золотым шарикам с применением запатентованной липид-полимерной смеси TransIT®-2020 (№ по кат. MIR 5404, Mirus Bio LLC, Madison, WI 5371). Раствор ДНК готовили с использованием 1 мкг плазмидной ДНК и необязательно другие конструкции готовили для совместной бомбардировки с использованием 10 нг (0,5 мкл) каждой плазмиды. К предварительно смешанной ДНК добавляли 50 мкл подготовленных частиц золота (30 мг/мл) и 1 мкл TransIT®-2020 и осторожно перемешивали. Обеспечивали инкубирование конечной смеси при постоянном перемешивании вихревым способом при низкой скорости в течение 10 минут. После периода осаждения пробирки быстро центрифугировали и удаляли жидкость. Частицы золота осаждали в микроцентрифуге при 10000 об./мин. в течение 1 мин. и удаляли надосадочную жидкость. Добавляли 120 мкл 100% EtOH и частицы ресуспендировали путем быстрой ультразвуковой обработки. Затем 10 мкл наносили на центр каждого макроносителя и обеспечивали высушивание в течение приблизительно 2 минут перед бомбардировкой, всего десять аликвот отбирали из каждой пробирки с подготовленными частицами/ДНК.

Планшеты с образцами бомбардировали с помощью Biolistic PDA-1000/He (Bio-Rad). Эмбрионы находятся на расстоянии 6 см от макроносителя с зазором 1/8 дюйма между разрывным диском с давлением разрыва 200 фунтов на квадратный дюйм и макроносителем. Все образцы получали однократный выстрел.

После бомбардировки эмбрионы инкубовали на бомбардировочной пластине в течение ~ 20 часов, затем переносили в 13266L (среда для отдыха/индукции) на 7-9 дней при значениях температуры в

диапазоне 26–30°C. Затем эмбрионы переносили в среду для созревания 289Н на ~ 21 день. Затем зрелые соматические зародыши переносили в среду для прорастания 272G и переносили на свет. Примерно через 1–2 недели для анализа отбирали проростки, содержащие жизнеспособные побеги и корни, и отправляли в теплицу, где их переносили в лотки (эквивалентные 2,5-дюймовому горшку), содержащие почву для горшков. Через 1–2 недели растения переносили в 600 классических горшков (1,6 галлона) и выращивали до зрелости.

#### Среда

Среда для бомбардировки (13224E) содержит 4,0 г/л основных солей N6 (SIGMA C-1416), 1,0 мл/л витаминной смеси Эрикссона (1000X SIGMA-1511), 0,5 мг/л тиамин-НСl, 190,0 г/л сахарозы, 1,0 мг/л 2,4-D и 2,88 г/л L-пролина (доведенных до объема с помощью D-I H<sub>2</sub>O после доведения pH до 5,8 с помощью КОН); 6,3 г/л агара Sigma (добавленного после доведения до объема с помощью D-I H<sub>2</sub>O) и 8,5 мг/л нитрата серебра (добавленного после стерилизации среды и охлаждения до комнатной температуры).

Среда для отбора (13266L) содержит 1650 мг/л нитрата аммония, 277,8 мг/л сульфата аммония, 5278 мг/л нитрата калия, хлорид кальция, 407,4 мг/л безводного хлорида кальция, 234,92 мг/л безводного сульфата магния, 410 мг/л безводного фосфата калия, 8 мг/л одноосновной борной кислоты, 8,6 мг/л, сульфата цинка·7H<sub>2</sub>O, 1,28 мг/л йодида калия, 44,54 мг/л сульфата железа·7H<sub>2</sub>O, 59,46 мг/л Na<sub>2</sub>edta·2H<sub>2</sub>O, 0,025 мг/л хлорида кобальта·6H<sub>2</sub>O, 0,4 мг/л молибденовой кислоты (натриевая соль)·2H<sub>2</sub>O, 0,025 мг/л сульфата меди·5H<sub>2</sub>O, 6 мг/л моногидрата сульфата марганца, 2 мг/л тиамин, 0,6 мл/л b5h микросолей 1000x, 0,4 мл/л витаминов Эрикссона 1000x, 6 мл/л s&h исходного раствора витаминов 100x, 1,98 г/л L-пролина, 3,4 мг/л нитрата серебра, 0,3 г/л казеинового гидролизата (кислоты), 20 г/л сахарозы, 0,6 г/л глюкозы, 0,8 мг/л 2,4-d, 1,2 мг/л дикамбы, 6 г/л tc агара, 100 мг/л агрибио карбенициллина, 25 мг/л цефотаксима и 150 мг/л генетицина (g418)

Среда для регенерации растений (289Н) содержала 4,3 г/л солей по MS (GIBCO 11117-074), 5,0 мл/л исходного раствора витаминов по MS (0,100 г никотиновой кислоты, 0,02 г/л тиамин-НСl, 0,10 г/л пиридоксин-НСl и 0,40 г/л глицина, доведенных до объема с помощью очищенной D-I H<sub>2</sub>O) (Murashige and Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:473), 100 мг/л миоинозита, 0,5 мг/л зеатина,

60 г/л сахарозы и 1,0 мл/л 0,1 мМ абсцизовой кислоты (доведенных до объема очищенной D-I H<sub>2</sub>O после доведения pH до 5,6); 8,0 г/л агара Sigma (добавленного после доведения до объема с помощью D-I H<sub>2</sub>O), а также 1,0 мг/л индолилуксусной кислоты и 150 мг/л генетицина (G418) (добавленных после стерилизации среды и охлаждения до 60°C).

Безгормональная среда (272G) содержала 4,3 г/л солей по MS (GIBCO 11117-074), 5,0 мл/л исходного раствора витаминов по MS (0,100 г/л никотиновой кислоты, 0,02 г/л тиамина-HCl, 0,10 г/л пиридоксина-HCl и 0,40 г/л глицина, доведенных до объема с помощью очищенной D-I H<sub>2</sub>O), 0,1 г/л миоинозита и 40,0 г/л сахарозы (доведенных до объема с помощью очищенной D-I H<sub>2</sub>O после доведения pH до 5,6); и 0,5 мг/л IBA и 150 мг/л генетицина (G418) и 6 г/л бактоагара (добавленного после доведения до объема с помощью очищенной D-I H<sub>2</sub>O), ее стерилизовали и охлаждали до 60°C.

#### Скрининг растений T0 и характеристика трансформанта

Для идентификации положительных трансформантов с делецией повторяющихся последовательностей, геномную ДНК выделяли из ткани листьев растений T0 и проводили ПЦР с использованием мастер-микса Phusion (Thermo Scientific F-581) и праймеров, перечисленных в таблице 3. Расположения праймеров показаны на фигуре 1. Ампликоны получали при расщеплении TS2/TS4 или TS2/ST1-TS1; последовательность (~35 т. о.) между двумя сайтами удаляли, а остальные последовательности объединяли. Получали варианты с делецией с ожидаемым размером продукта.

Секвенирование следующего поколения (NGS) применяли для оценки последовательностей участков границы сплайсинга у положительных трансформантов с делецией. Участки границы сплайсинга амплифицировали с помощью ПЦР посредством мастер-микса для высокоточной ПЦР PHUSION® (Thermo Scientific, F-531). Одни и те же праймеры можно использовать как для делеций CR2/CR4, так и для CR2/ST1-CR1. Праймеры, применяемые в первичной реакции ПЦР, показаны в таблице 3, а праймеры, применяемые во вторичной реакции ПЦР, представлены в SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13. "NNNNNNNN" в обратном праймере представляет собой последовательность штрих-кодов, соответствующую местоположению образца на планшете. На фигуре 2А показана последовательность участков границы сплайсинга, полученная при делеции TS2/TSS4; и на фигуре 2В показаны

последовательности участков границы сплайсинга, полученные при делеции TS2/ST1-TS1. Краткое описание полученных трансформантов T0 с делецией представлено в таблице 4.

Таблица 3. Праймеры, используемые для скрининга делеции повторяющихся последовательностей

Название делеции	Название праймера	Ориентация праймера	Праймер SEQ ID NO:
Ht1-CR2-CR4 de	Ht1f3	Прямой	SEQ ID NO:10
	Ht1r4v2	Обратный	SEQ ID NO:11

Таблица 4. Краткое описание трансформантов T0 с делецией

Направляющая	Количество эмбрионов, подвергшихся бомбардировке	Количество растений T0, подвергшихся скринингу	Количество растений с делецией
CR2/CR4	2000	178	59
CR2/ST1	1000	108	29

#### Анализ T1

Растения T0 с повторяющейся последовательностью Ht1 переносили в контролируемую среду. Пыльцу из растений T0 переносили в рекуррентные родительские растения для получения семян. Растения T1 подвергали более обширному определению молекулярной характеристики, не только с целью подтвердить, что мутации, наблюдаемые в растении T0, были стабильно унаследованы, но также и убедиться, что растения T1 или более позднего поколения были свободны от любых чужеродных элементов ДНК, используемых в процессе трансформации. Во-первых, qPCR выполняли для всех хелперных генов, в том числе Cas9, направляющая РНК, селективный маркер трансформации (NPTII) и гены, усиливающие трансформацию ODP2 и WUS2, чтобы убедиться, что гены отделены от полученных мутантных аллелей. Образцы растений T1 будут отобраны с использованием анализа секвенирования по Саузерну (SbS), чтобы дополнительно продемонстрировать, что растения не содержат какой-либо чужеродной ДНК.

#### ПРИМЕР 2

##### РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ HT1 ПОСРЕДСТВОМ ЗАМЕЩЕНИЯ АЛЛЕЛЯ

##### Отбор целевого сайта

Сайт-направленную нуклеазную систему gRNA/Cas9, описанную в WO2015026885, WO20158026887, WO2015026883 и WO2015026886,



использовали для редактирования гена *Ht1* путем замещения нативного аллеля связанным с устойчивостью аллелем *Ht1* из PH4GP (US2010095395; SEQ ID NO:65). Следующие пары целевых сайтов использовали для удаления всего аллеля *Ht1* из линии PH184C (US 8445763), включая предполагаемый промотор, кодирующую последовательность и 1 т. о. 3'-UTR: HT1-TS6 и HT1-TS9, а также HT1-TS7 и HT1-TS10. Расположение каждого целевого сайта и схематическое изображение обмена аллелями показаны на фигуре 3. Целевые последовательности перечислены в таблице 5. Матрицу для репарации ДНК совместно доставляли с плазмидами Cas9 и направляющей РНК.

Таблица 5. Последовательности целевого сайта для аллельного замещения HT1

Обозначение целевого сайта	Последовательность геномного целевого сайта маиса	Последовательность PAM
HT1-TS6	SEQ ID NO:14	TGG
HT1-TS7	SEQ ID NO:15	CGG
HT1-TS9	SEQ ID NO:16	AGG
HT1-TS10	SEQ ID NO:17	AGG

Векторная конструкция Cas9

См. пример 1.

Векторная конструкция направляющей РНК

С целью направления нуклеазы Cas9 в обозначенные геномные целевые сайты (в таблице 4), промотор U6 полимеразы III (SEQ ID NO:6; см. WO2015026885, WO20158026887, WO2015026883 и WO2015026886) и его родственные терминаторные последовательности U6 полимеразы III (TTTTTTTT) использовали для управления инициацией и терминацией экспрессии gRNA. Вариабельные нацеливающие домены направляющей РНК для редактирования генов HT1 идентифицированы как HT1-CR6, HT1-CR7, HT1-CR9 и HT1-CR10, которые соответствуют геномным целевым сайтам HT1-TS6, HT1-TS7, HT1-TS9 и HT1-TS10, соответственно. Олиго, содержащие ДНК, кодирующую каждый из вариабельных доменов, нацеленных на нуклеотиды, синтезировали и клонированы в кассету экспрессии gRNA, как описано в примере 1. Каждая кассета экспрессии направляющей РНК состоит из промотора U6 полимеразы III маиса, функционально связанного с одной из ДНК-версий направляющей РНК (таблица 6), и затем родственной терминаторной

последовательности U6 полимеразы III. ДНК-версия направляющей РНК состоит из соответствующего нуклеотидного переменного нацеливающего домена, за которым следует полинуклеотидная последовательность, способная взаимодействовать с эндонуклеазой, индуцирующей двухнитевый разрыв.

Таблица 6. Кассеты экспрессии направляющей РНК для обмена аллелей Ht1

Название	ДНК-версия направляющей РНК SEQ ID NO:
HT1-CR6	SEQ ID NO:18
HT1-CR9	SEQ ID NO:19
HT1-CR7	SEQ ID NO:20
HT1-CR10	SEQ I D NO:21

*Векторная конструкция матрицы для репарации*

Матрица для замещения/замены CR6/CR9 содержит связанный с устойчивостью аллель ZM-HT1-(PH4GP) и последовательности гомологии, фланкирующие 5' HT1-TS6 и 3' HT1-TS9; матрица для замещения CR7/CR10 содержит тот же связанный с устойчивостью аллель ZM-HT1-(PH4GP) и последовательности гомологии, фланкирующие 5' HT1-TS7 и 3' HT1-TS11 в линии PH184C. Последовательности плеч гомологии (SEQ ID NO:81-84) синтезировали и затем клонировали с помощью заместительных геномных последовательностей ZM-HT1-(PH4GP) с помощью стандартного бесшовного способа клонирования Гибсона.

*Доставка ДНК системы направляющая РНК/эндонуклеаза Cas9 в маис*

Плазмиды, содержащие кассеты экспрессии Cas9, направляющей РНК, а также матрицу для замещения, описанные выше, подвергали совместной бомбардировке плазмидами, содержащими селектируемый маркер трансформации NPTII и гены ODP2, контролирующие развитие, усиливающие трансформацию (фактор транскрипции ODP2 с доменами AP2 (отвечающий за развитие семязачатка белок 2)) и Wuschel (20151030-6752 USPSP) в геномы элитных линий маиса. Трансформацию незрелых зародышей маиса можно выполнять с применением любого способа, известного из уровня техники, или способа, описанного в примере 1.

*Скрининг растений T0 и характеристика трансформанта*

Протокол экстракции ДНК из листьев растения T0 является таким же, как описано в примере 1. Для выявления положительных

трансформантов при обмене была выполнена ПЦР с использованием готовой смеси Sigma Extract-N-Amp PCR. ПЦР проводили для анализа участков границы сплайсинга HR1 с использованием пары праймеров Ht1HR1f1/Ht1HR1r1, тогда как первичную ПЦР с парой праймеров Ht1HR2 f1 и Ht1HR2r1 комбинировали с вторичной qPCR с аллельной дифференциацией для скрининга участков границы сплайсинга HR2 из-за высокой гомологии предполагаемых отредактированных вариантов и немодифицированной геномной последовательности. Праймеры для первичной ПЦР и праймеры и зонды для 2-ой qPCR перечислены в таблице 7. Тот же анализ, описанный ранее для обмена CR6/CR9, также используется для скрининга трансформантов обмена аллелей CR7/CR10.

Таблица 7. Праймеры, используемые для скрининга вариантов обмена аллелей Ht1

	Название праймера	Ориентация праймера	Последовательность праймера для первой ПЦР
Участок границы сплайсинга HR1	Ht1HR1f1	Прямой	SEQ ID NO:22
	Ht1HR1r1	Обратный	SEQ ID NO:23
Участок границы сплайсинга HR2	Ht1HR2f1	Прямой	SEQ ID NO:24
	Ht1HR2r1	Обратный	SEQ ID NO:25
Участок границы сплайсинга HR2 2-ой qPCR	hdr2b_f	Прямой	SEQ ID NO:26
	hdr2b_r	Обратный	SEQ ID NO:27
	hdr2b_PV	Зонд	6FAM-SEQ ID NO:28
	hdr2b_PG	Зонд	VIC-SEQ ID NO:29

Идентифицированные варианты обмена аллелей будут дополнительно молекулярно охарактеризованы, и qPCR будет использоваться для скрининга растений T1 (BC0) на нулевые сегреганты, которые, как ожидается, не содержат плазмидную ДНК, используемую во время инициации трансформации. Секвенирование по Саузерн также будет выполняться для подтверждения нулевых сегрегантных растений. В таблице 8 показано краткое описание результатов T0, полученных в экспериментах по обмену аллелями.

Три растения T0 были идентифицированы как потенциальные варианты обмена аллелей среди 300 растений T0, подвергшихся скринингу.

Таблица 8. Краткое описание результатов скрининга обмена аллелей T0

Количество T0, подвергшиеся скринингу	Количество T0 HR1	Количество T0 HR2	Количество T0 HR1+HR2
100	2	2	1
150	13	3	1
50	4	3	1

ПРИМЕР 3

Редактирование генов NLB18 посредством замещения аллеля  
Отбор целевого сайта

Ген ассоциированной с клеточной стенкой киназы (WAK), NLB18, был идентифицирован и подтвержден как ген устойчивости к северной пятнистости листьев (WO2011163590). Ген NLB18 кластеризован с NLB17 на длинном плече хромосомы 8. Гены NLB18 и NLB17 находятся на расстоянии 6,9 т. о. и имеют высокую степень гомологии; таким образом, идентификация уникального целевого сайта для обмена аллелями NLB18 является сложной задачей. Было идентифицировано множество сайтов и протестировано направляющие РНК. Направляющие, которые вырезали только область гена NLB18, а не область гена NLB17, были отобраны для замены аллеля NLB18.

Сайт-направленную нуклеазную систему gRNA/Cas9, описанную в WO2015026885, WO20158026887, WO2015026883 и WO2015026886, использовали для редактирования гена NLB18. Следующие пары целевых сайтов использовали для удаления всего аллеля NLB18 из линии PH184C, включая потенциальный промотор, кодирующую последовательность и 3'-UTR: NLB18-TS1 и NLB18-TS4, а также NLB18-TS8 и NLB18-TS4. Расположение каждого целевого сайта в локусе NLB18 и схематическое изображение обмена аллелями показаны на фигуре 5. Целевые последовательности перечислены в таблице 9. Удаленный аллель замещен связанным с устойчивостью аллелем NLB18 из PH26N (US 6765132; SEQ ID NO:70); матрицу для репарации ДНК совместно доставляли с плазмидами Cas9 и направляющей РНК.

Таблица 9. Последовательности целевого сайта для аллельного замещения NLB18

Обозначение целевого сайта	Последовательность геномного целевого сайта маиса	Последовательность PAM
NLB18-TS1	SEQ ID NO:30	TGG
NLB18-TS8	SEQ ID NO:31	CGG
NLB18-TS4	SEQ ID NO:32	GGG

Векторная конструкция Cas9

См. пример 1

Векторная конструкция направляющей РНК

С целью направления нуклеазы Cas9 в обозначенные геномные целевые сайты (в таблице 9), промотор U6 полимеразы III (SEQ ID NO:6; см. WO2015026885, WO20158026887, WO2015026883 и WO2015026886) и его родственные терминаторные последовательности U6 полимеразы III (TTTTTTTT) использовали для управления инициацией и терминацией экспрессии gRNA. Вариабельные нацеливающие домены направляющей РНК для гена NLB18 идентифицированы как NLB18-CR1, NLB18-CR8 и NLB18-CR4, которые соответствуют геномным целевым сайтам NLB18-TS1, NLB18-TS8 и NLB18-TS4, соответственно. Олиго, содержащие ДНК, кодирующую каждый из вариабельных доменов, нацеленных на нуклеотиды, были синтезированы и клонированы в кассету экспрессии gRNA, как описано выше в примере 1. Каждая кассета экспрессии направляющей РНК состоит из промотора U6 полимеразы III маиса, функционально связанного с одной из ДНК-версий направляющей РНК (таблица 10), и затем родственной терминаторной последовательности U6 полимеразы III. ДНК-версия направляющей РНК состоит из соответствующего нуклеотидного вариабельного нацеливающего домена, за которым следует полинуклеотидная последовательность, способная взаимодействовать с эндонуклеазой, индуцирующей двухнитевый разрыв.

Таблица 10. Кассеты экспрессии направляющей РНК для обмена аллелей NLB18

Название	ДНК-версия направляющей РНК SEQ ID NO:
NLB18-CR1	SEQ ID NO:33
NLB18-CR8	SEQ ID NO:34
NLB18-CR4	SEQ ID NO:35

Векторная конструкция матрицы для замещения

Матрицы для замещения/замены NLB18-CR1/CR4 содержат связанный с устойчивостью аллель ZM-NLB18 (из PH26N) и последовательности гомологии, фланкирующие 5' NLB18-TS1 (SEQ ID NO:67) и 3' NLB18-TS4 (SEQ ID NO:68) в PH184C; матрицы для замещения NLB18-CR1/CR4 содержат тот же связанный с устойчивостью аллель ZM-NLB18 (из PH26N) и последовательности гомологии, фланкирующие 5' NLB18-TS8 (SEQ ID NO:69) и 3' NLB18-TS4 (SEQ ID NO:68) в PH184C. SEQ ID NO:66 представляет собой нуклеотидную последовательность NLB18 из PH184C, в том числе от 5' NLB18-CR8 по 3' NLB18-CR4. Последовательности плеч гомологии синтезировали с дополнительной последовательностью, содержащей сайты рестрикции; после рестрикционного расщепления их собирали вместе с желаемым связанным с устойчивостью аллелем NLB18 (из PH26N) в остов дрожжей, используя стандартные протоколы сборки для дрожжей *in vivo*. Плазмиды из объединенных дрожжевых трансформантов реакции сборки извлекали в *E. coli*, и плазмиды, прошедшие контроль качества, использовали в качестве матриц для совместной бомбардировки.

Доставка ДНК системы направляющая РНК/эндонуклеаза Cas9 в маис

Плазмиды, содержащие кассеты экспрессии Cas9, направляющей РНК, а также матрицы для замещения, описанные выше, подвергали бомбардировке плазмидами, содержащими селективируемый маркер трансформации NPTII и гены ODP2, контролирующие развитие, усиливающие трансформацию (фактор транскрипции ODP2 с доменами AP2 (отвечающий за развитие семязачатка белок 2)) и Wuschel (20151030-6752 USPSP) в геномы элитных линий маиса. Трансформацию незрелых зародышей маиса можно выполнять с применением любого способа, известного из уровня техники, или с применением способа, описанного в примере 1.

Скрининг растений T0 и характеристика трансформанта

Скрининг будет проводиться аналогично экспериментам, описанным ранее.

ПРИМЕР 4

ПЕРЕМЕЩЕНИЕ СВЯЗАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ АЛЛЕЛЕЙ HT1 И NLB18 В СЛОЖНЫЙ ЛОКУС ПРИЗНАКОВ

Отбор целевых сайтов

Геномное окно маиса, простирающееся от ZM01:13.7MM до ZM01:16.4MM на хромосоме 1, идентифицировали и разрабатывали для

превращения в сложный локус признаков (CTL) 1 (WO2016040030). Три сайта CTL1, TS8, TS10 и TS45 были отобраны для перемещения генов, устойчивых к NLB, NLB18-PH26N (SEQ ID NO:70), Ht1-PH4GP (SEQ ID NO:65) и NLB18-PH26N (SEQ ID NO:70) соответственно. В таблице 11 показаны положения генетической карты для целевых сайтов для эндонуклеазы Cas (TS8, TS45, TS10), а на фигуре 6 схематично показано расположение этих сайтов.

ТАБЛИЦА 11. Целевые сайты для эндонуклеазы Cas в сложном локусе признаков (CTL1) на хромосоме 1 маиса

Целевой сайт	Последовательность целевого сайта	Последовательность PAM	Генетическое положение RH B73v2 (cM)
CTL1-TS8	SEQ ID NO:36	TGG	52,56
CTL1-TS45	SEQ ID NO:37	AGG	53,66
CTL1-TS10	SEQ ID NO:38	GGG	54,56

Векторная конструкция Cas9, направляющей РНК и донорной матрицы

Ген Cas9 из *Streptococcus pyogenes* M1 GAS (SF370) оптимизировали по кодону маиса с помощью стандартных методик, известных из уровня техники, и интрон картофеля ST-LS1 вводили с целью устранения его экспрессии в *E.coli* и *Agrobacterium*. Для облегчения внутриядерной локализации белка Cas9 в клетках маиса (SV40) одинарный аминоконцевой сигнал внутриядерной локализации *Simian virus 40* (SEQ ID NO:5) и двухсоставную последовательность сигнала внутриядерной локализации карбоксильного конца эндонуклеазы VirD2 для пограничных участков Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* (SEQ ID NO:80) были включены в аминоконцевые и карбоксильные концы открытой рамки считывания Cas9 соответственно. SEQ ID NO:73 представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую Cas9, используемую в примере 4; SEQ ID NO:73 содержит экзон 1 (SP) cas9, интрон 2 ST-LS1, экзон 2 (SP) Cas9 и сигнал внутриядерной локализации VirD2. (Версия SP Cas9 отличается от версии ST, используемой в предыдущих примерах, в отношении использования кодонов; однако версия SP и версия ST, кодируемые SEQ ID NO: 4, идентичны.) Оптимизированной ген Cas9 маиса функционально связывали с убиквитиновым промотором маиса с помощью стандартных методик молекулярной биологии.

Промотор U6 полимеразы III маиса (SEQ ID NO:6; см. WO2015026885, WO20158026887, WO2015026883 и WO2015026886)

применяли для экспрессии направляющих РНК, которые направляют нуклеазу Cas9 в обозначенные геномные сайты. Кодированная последовательность направляющей РНК составляла 77 п. о. в длину и содержала переменный нацеливающий домен длиной 12-30 п. о. из выбранного целевого сайта генома кукурузы на 5'-конце терминатора U6 полимеразы III кукурузы.

Для того чтобы эндонуклеаза Cas9 и направляющая РНК образовывали комплекс белок/РНК для обеспечения сайт-специфического расщепления двухнитевой ДНК, эндонуклеаза Cas9 и направляющая РНК должны присутствовать одновременно. Для улучшения их совместной экспрессии и присутствия кассеты экспрессии эндонуклеазы Cas9 и направляющей РНК были соединены в одну ДНК-конструкцию. Синтезировали последовательность из 480-490 п. о., содержащую кодирующую последовательность направляющей РНК, переменный нацеливающий домен из 12-30 п. о. из выбранного целевого сайта генома кукурузы и часть U6 промотора. Затем последовательность клонировали в остов, уже имеющий кассету экспрессии cas9 и остальную часть экспрессирующей кассеты gRNA посредством рестрикционных сайтов BstBI/HindIII.

Перемещающая матрица для CTL1-8CR1 содержит связанный с устойчивостью аллель ZM-NLB18 (из PH26N) (SEQ ID NO:70) и последовательности гомологии, фланкирующие 5' CTL1-TS8 (SEQ ID NO:85) и 3' CTL1-TS8 (SEQ ID NO:86) в PH184C. Перемещающая матрица для CTL1-45CR1 содержит связанный с устойчивостью аллель ZM-NLB18 (из PH26N) (SEQ ID NO:70) и последовательности гомологии, фланкирующие 5' CTL1-TS45 (SEQ ID NO:87) и 3' CTL1-TS45 (SEQ ID NO:88) в PH184C. Перемещающая матрица для CTL1-10CR3 содержит связанный с устойчивостью аллель ZM-HT1 (из PH4GP) (SEQ ID NO:65) и последовательности гомологии, фланкирующие 5' CTL1-TS10 (SEQ ID NO:89) и 3' CTL1-TS10 (SEQ ID NO:90) в PH184C. Синтезировали последовательности плеч гомологии из 300-500 п. о. и затем клонировали с желаемой последовательностью связанного с устойчивостью аллеля с помощью стандартного бесшовного способа клонирования Гибсона.

Плазмиду, содержащую кодон-оптимизированную кассету экспрессии эндонуклеазы Cas9 кукурузы и кассеты экспрессии направляющей РНК, совместно доставляли с плазмидой, содержащей матрицу ДНК, содержащую NLB18-PH26N (фигура 7 или фигура 8) или ZM-HT1 (PH4GP) (фигура 9), которые после интеграции генов путем гомологичной рекомбинации (репарации, направляемой гомологией)



будут интегрированы в указанном сайте при расщеплении сайтов посредством Cas9.

Направляющие конструкции РНК-ДНК, нацеленные на различные геномные сайты маиса, и матричные ДНК-конструкции, которые были сконструированы для введения устойчивых генов в целевые сайты для эндонуклеазы Cas посредством гомологичной рекомбинации (репарации, направляемой гомологией), представлены в таблице 12. Такие направляющие РНК, ДНК-конструкции Cas9 и матрицы для репарации ДНК совместно доставлялись в геном элитного маиса (например, PH184C) с помощью процедуры стабильной трансформации, описанной в примере 1.

Таблица 12. Направляющая РНК/Cas9 и матрица для репарации ДНК, применяемые в стабильной трансформации маиса для вставки Ht1-PH4GP или NLB18-PH26N в ZM01 CTL1.

Эксперимент	Направляющая РНК	SEQ ID NO:	Перемещение матричной ДНК	SEQ ID NO:
CTL1-TS8	ZM-U6:08CR1	74	08CR1HR1-NLB18 (PH26N) геномная последовательность- 8CR1HR2	77
CTL1-TS45	ZM-U6:45CR1	75	45CR1HR1-NLB18 (PH26N) геномная последовательность- 45CR1HR2	78
CTL1-TS10	ZM-U6:10CR3	76	10CR3HR1-HT1 (PH4GP) геномная последовательность- 10CR3HR2	79

Доставка ДНК системы направляющая РНК/эндонуклеаза Cas9 в маис

См. пример 1.

Скрининг растений T0 и характеристика трансформанта

С целью идентифицировать трансформанты с перемещением (положительные трансформанты со вставкой), геномную ДНК выделяли из ткани листьев растений T0, и проводили ПЦР участка границы сплайсинга с применением готовой смеси Sigma Extract-N-Amp PCR. Расположение праймеров показано на фигурах 7, 8 и 9, а последовательности праймеров приведены в таблице 13. ПЦР-

скрининг участков границы сплайсинга для трансформантов со вставкой показал три растения T0 с обоими участками границы сплайсинга HR1 и HR2 для эксперимента CTL1-TS8, четыре растения T0 с обоими участками границы сплайсинга HR1 и HR2 для эксперимента CTL1-TS10 и четыре растения T0 с обоими участками границы сплайсинга HR1 и HR2 для эксперимента CTL1-TS45. Идентифицированные растения T0 будут дополнительно охарактеризованы в следующем поколении.

Таблица 13. Праймеры, применяемые для скрининга вставки (перемещения) у трансформанта

Эксперименты	Название праймера	Ориентация праймера	Последовательность праймера
NLB18-PH26N до CTL1 TS8	8HR1f1	Прямой	SEQ ID NO:39
	PH26NPr	Обратный	SEQ ID NO:40
	PH26NTf	Прямой	SEQ ID NO:41
	8HR2r1	Обратный	SEQ ID NO:42
Ht1-PH4GP до CTL1 TS10	10HR1f	Прямой	SEQ ID NO:43
	Ht1Pr	Обратный	SEQ ID NO:44
	Ht1Tf	Прямой	SEQ ID NO:45
	10HR2r	Обратный	SEQ ID NO:46
NLB18-PH26N до CTL1 TS45	45hr1f1	Прямой	SEQ ID NO:47
	PH26NPr	Обратный	SEQ ID NO:48
	PH26NTf	Прямой	SEQ ID NO:49
	45hr2r1	Обратный	SEQ ID NO:50

Скрининг растений T2 и характеристика трансформанта

Растения T0, содержащие перемещение NLB18 (BC26N) и HT1 (ED4GP), подвергали обратному скрещиванию с рекуррентными родителями дикого типа для получения семян BC0 (T1). Проростки BC0 были молекулярно охарактеризованы для ПЦР участков границы сплайсинга, чтобы подтвердить вставку в CTL1-TS45 с NLB18 (BC26) и вставку в CTL1-TS10 с HT1 (ED4GP), унаследованную для следующего поколения. qPCR для хелперных генов, используемых во время трансформации, также выполняли, чтобы убедиться, что они были отделены от перемещающихся растений, нулевые сегреганты также были подтверждены посредством Sbs (секвенирование по Саузерну). Семена от своих растений (BC0F2) садили в поле, проводили анализ зиготности на образцах листьев, соотношение вставок гомозигот:гемизигот:ноль 1:2:1 наблюдали как для CTL1-

TS45 с BC26N, так и для STL1-TS10 с HT1 (ED4GP) вставкой. Растения также анализировали в отношении экспрессии РНК с применением qRT-PCR после инокуляции NLB. По сравнению с нулевым результатом, как гемизиготы, так и гомозиготы показали устойчивость к инфекции, и экспрессия как NLB18, так и HT1 была повышена (фиг. 10 и 11).

Трансформанты подвергали тестированию в теплице в отношении эффективности к патогену северной пятнистости листьев (*Exserohilum turcicum*). Сначала все трансформанты заражали патогеном, в отношении которого, как известно, гены *Ht1* и *NLB18* обеспечивают устойчивость. Все положительные трансформанты, определенные с помощью qPCR, были устойчивы к патогену. Результаты приведены в таблицах 14 и 15. Количество растений для каждого трансформанта указано в столбце "N", представляющем собой количество исследованных растений. Показатель устойчивости для NLNB находится в диапазоне от 1 до 9, причем 9 характеризует наибольшую устойчивость.

Таблица 14. TS10 Ht1-ED4GP

Зиготность	Среднее значение NLFBLT	Станд. ошибка NLFBLT	N
Гомозиготный	7,3	0,1	16
Гемизиготность	6,3	0,1	28
Ноль	4,9	0,1	12

Таблица 15. TS45 NLB18-BC26N

Зиготность	Среднее значение NLFBLT	Станд. ошибка NLFBLT	N
Гомозиготный	8,5	0,1	53,0
Гемизиготность	6,2	0,1	91,0
Ноль	4,7	0,1	55,0

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения растительной клетки с модифицированной нуклеотидной последовательностью *Ht1*, причем способ предусматривает:

а) введение сайт-специфической модификации в по меньшей мере один целевой сайт эндогенного геномного локуса, кодирующего *Ht1* в растительной клетке; и

б) получение растительной клетки, имеющей модифицированную нуклеотидную последовательность *Ht1*.

2. Способ по п. 1, дополнительно предусматривающий:

а) введение матрицы для замены *Ht1* в растительную клетку, где указанная матрица для замены *Ht1* содержит по меньшей мере одно изменение нуклеиновой кислоты по сравнению с эндогенными последовательностью, аллелем или геномным локусом, кодирующими *Ht1*, и где указанная матрица для замены *Ht1* включена в эндогенный геномный локус, кодирующий *Ht1*, или

б) выращивание растения из растительной клетки с модифицированной нуклеотидной последовательностью *Ht1*.

3. Способ по п. 1 где сайт-специфическую модификацию индуцируют нуклеазой, выбранной из группы, состоящей из TALEN, мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами и нуклеазы, ассоциированной с CRISPR.

4. Способ по п. 3, где указанное растение проявляет повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев.

5. Способ по п. 1, где указанная модифицированная нуклеотидная последовательность *Ht1* предусматривает делецию в промоторе эндогенной последовательности, кодирующей *HT1*.

6. Способ по п. 5, где двухнитевые разрывы для сайт-специфической модификации по меньшей мере одного целевого сайта вводят с помощью эндонуклеазы Cas9 и

где эндонуклеазу Cas9 направляют с помощью по меньшей мере одной направляющей РНК.

7. Способ по п. 6, где применяют:

а) две направляющие РНК, первую направляющую РНК, содержащую переменный нацеливающий домен, который комплементарен участку SEQ ID NO:1 [*Ht1*-TS2], на который осуществляют нацеливание, и вторую направляющую РНК, содержащую переменный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:2 [*Ht1*-TS4];

б) первую направляющую РНК, содержащую переменный

нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:1 [Ht1-TS2], и вторую направляющую РНК, содержащую вариабельный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:3 [Ht1-ST1-TS1].

8. Способ по п. 2, где указанная матрица для замены *Ht1* содержит нуклеотидную последовательность Ht1-PH4GP.

9. Способ по п. 8, где нуклеотидная последовательность *Ht1*-PH4GP содержит SEQ ID NO:59 или нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична SEQ ID NO:52.

10. Способ по п. 8, где нуклеотидная последовательность *Ht1*-PH4GP содержит SEQ ID NO:65.

11. Способ по п. 8, где указанную сайт-специфическую модификацию индуцируют эндонуклеазой Cas9, и где эндонуклеазу Cas9 направляют с помощью по меньшей мере одной направляющей РНК.

12. Способ по п. 11, где применяют две направляющие РНК:

a) первую направляющую РНК, содержащую вариабельный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:14 [Ht1-TS6], и вторую направляющую РНК, содержащую вариабельный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:16 [Ht1-TS9]; или

b) первую направляющую РНК, содержащую вариабельный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:15 [Ht1-TS7], и вторую направляющую РНК, содержащую вариабельный нацеливающий домен, который комплементарен SEQ ID NO:17 [Ht1-TS10].

13. Способ получения растительной клетки с геномным локусом, содержащим по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, где указанная по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность является гетерологичной по отношению к геномному локусу, причем способ предусматривает:

a) введение сайт-специфической модификации в по меньшей мере один целевой сайт геномного локуса растительной клетки;

b) введение, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, которая придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, где указанная по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность фланкирована 300-500 п.о.

нуклеотидных последовательностей, расположенных 5' или 3' относительно соответствующих целевых сайтов; и

с) получение растительной клетки, имеющей геномный локус, содержащий по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев.

14. Способ по п. 13, где:

а) указанную сайт-специфическую модификацию индуцируют нуклеазой, выбранной из группы, состоящей из TALEN, мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами и нуклеазы, ассоциированной с CRISPR;

б) указанный способ дополнительно предусматривает выращивание растения из растительной клетки, имеющей геномный локус, содержащий по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, которая придает повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев; или

с) указанная, по меньшей мере, одна нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из Ht1-PH4GP, NLB18-PH26N и NLB18-PH99N.

15. Способ по п. 13, где указанный геномный локус представляет собой CTL1.

16. Способ по п. 15, где нуклеотидная последовательность NLB18-PH26N нацелена на TS8 CTL1, нуклеотидная последовательность NLB18-PH4GP нацелена на TS10 CTL1, а нуклеотидная последовательность NLB18-PH26N нацелена на TS45 CTL1.

17. Способ по п. 16, где двухнитевые разрывы для сайт-специфической модификации по меньшей мере одного целевого сайта вводят с помощью эндонуклеазы Cas9, и

где эндонуклеазу Cas9 направляют с помощью, по меньшей мере, одной направляющей РНК.

18. Способ по п. 14, где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 59 или 65, или указанная по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 52.

19. Растительная клетка, полученная с помощью способа по любому из пп. 1-13.

20. Растение, содержащее указанную растительную клетку по п.19.

21. Семя, продуцируемое растением по п.20.

22. Растение, содержащее геномный локус, содержащий по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, придающую повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, где указанная по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность гетерологична геномному локусу.

23. Растение по п.22, отличающееся тем, что:

а) указанное растение проявляет повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев; или

б) указанная по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из: Ht1-PH4GP, NLB18-PH26N и NLB18-PH99N.

24. Растение по п.22, отличающееся тем, что указанный геномный локус представляет собой CTL1.

25. Растение по п. 22, отличающееся тем, что нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 59 или нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 52.

26. Растение по п.22, отличающееся тем, что нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO:65.

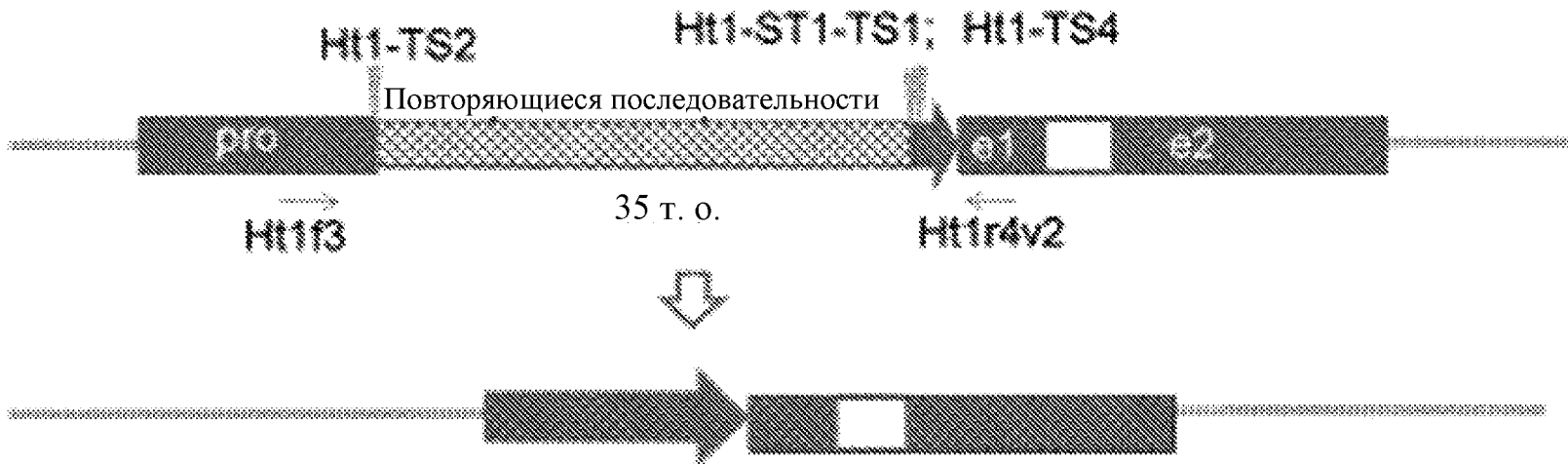
27. Растение по п.22, где нуклеотидная последовательность включает любую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:64.

28. Растение по п. 22, отличающееся тем, что нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 70.

29. Растение по п.22, где нуклеотидная последовательность включает любую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:62.

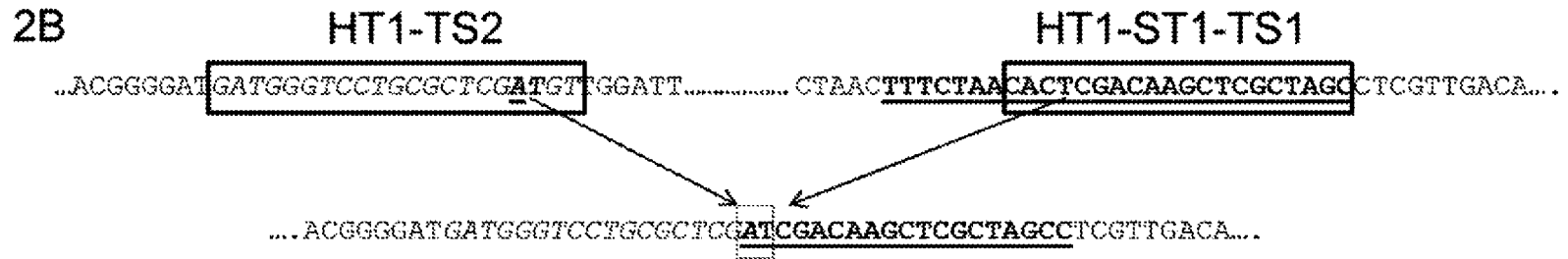
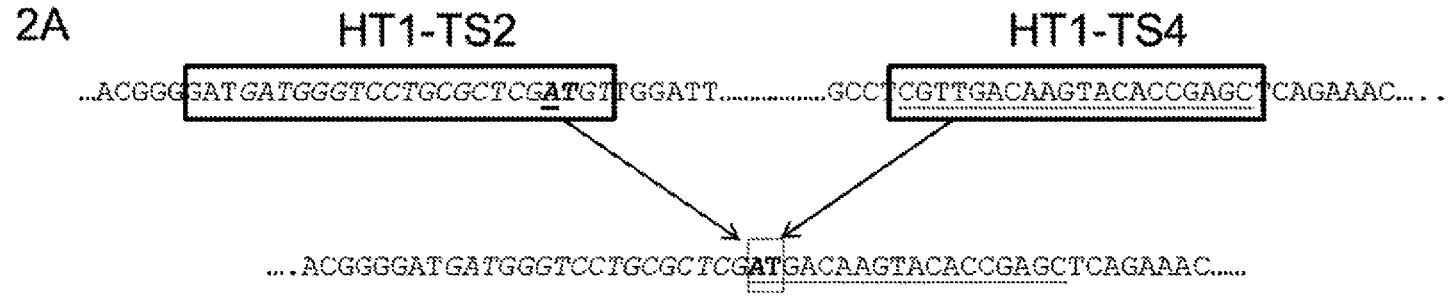
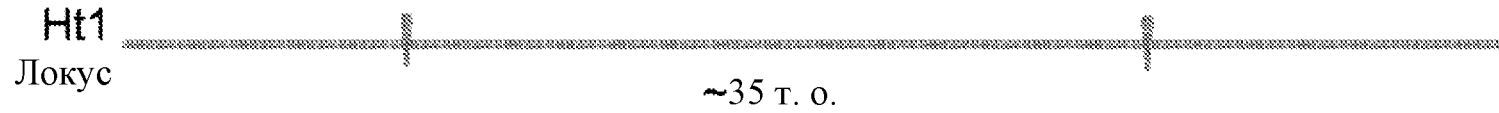
По доверенности

Фиг. 1

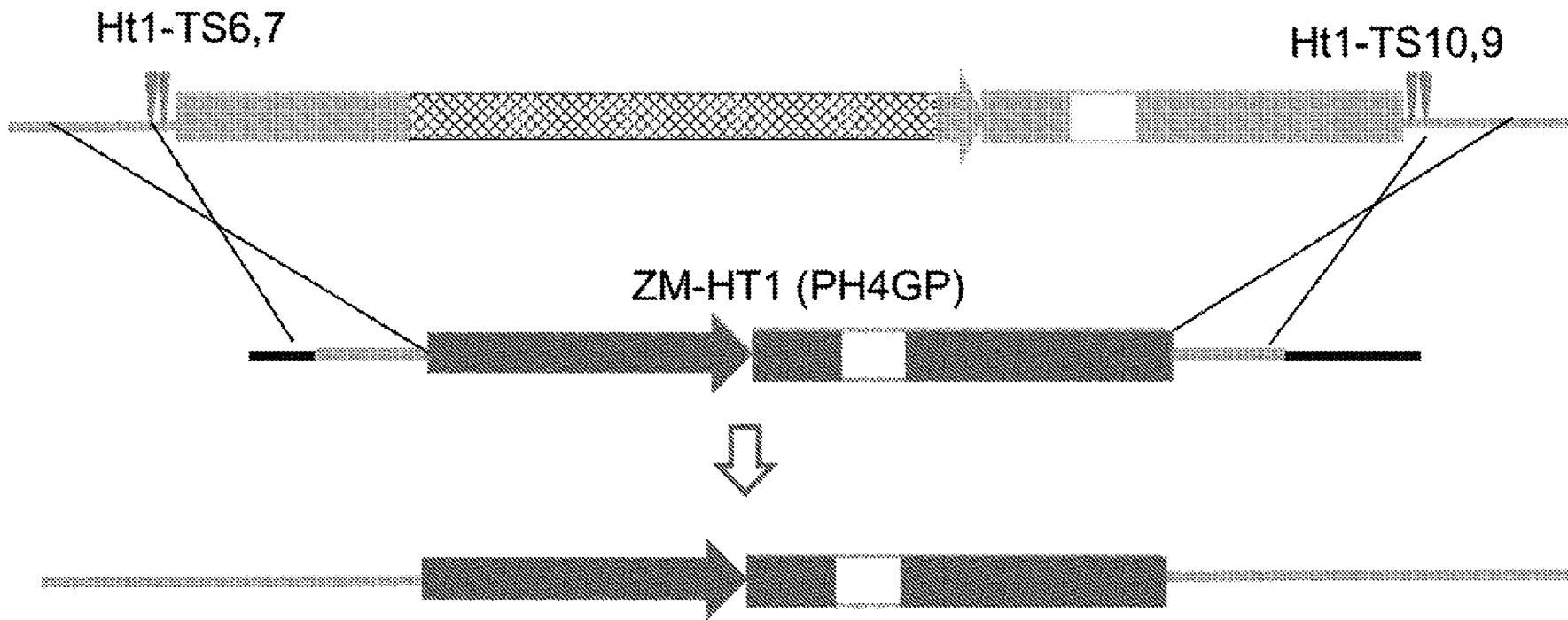




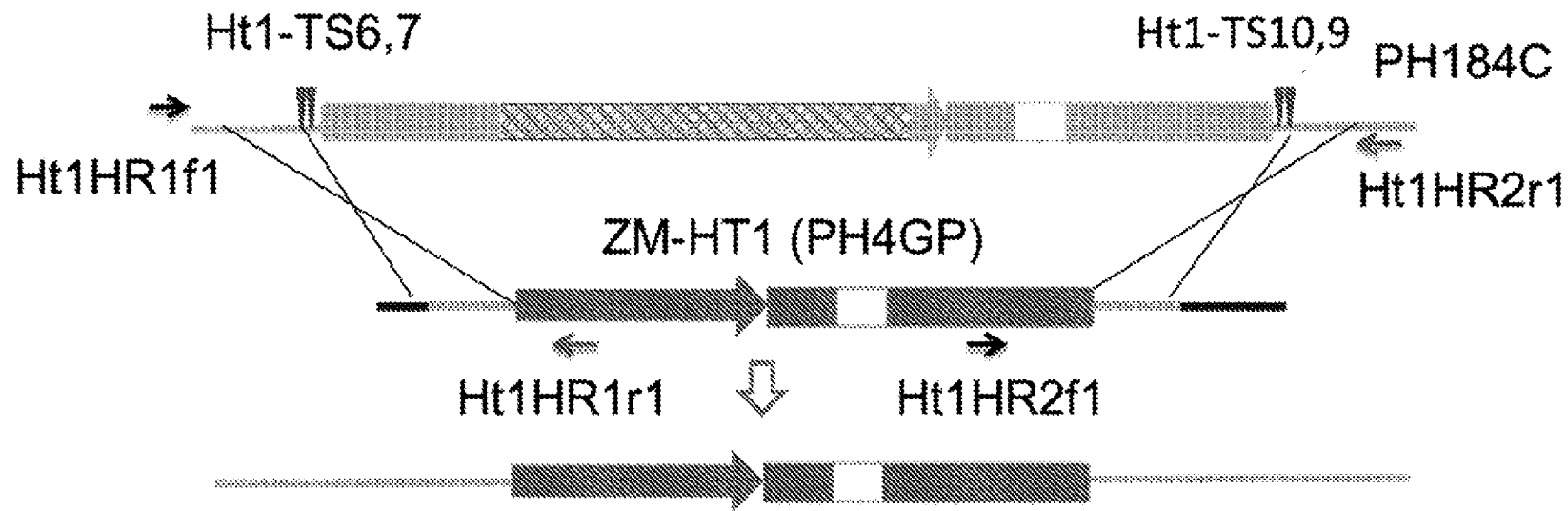
Фиг. 2А и 2В



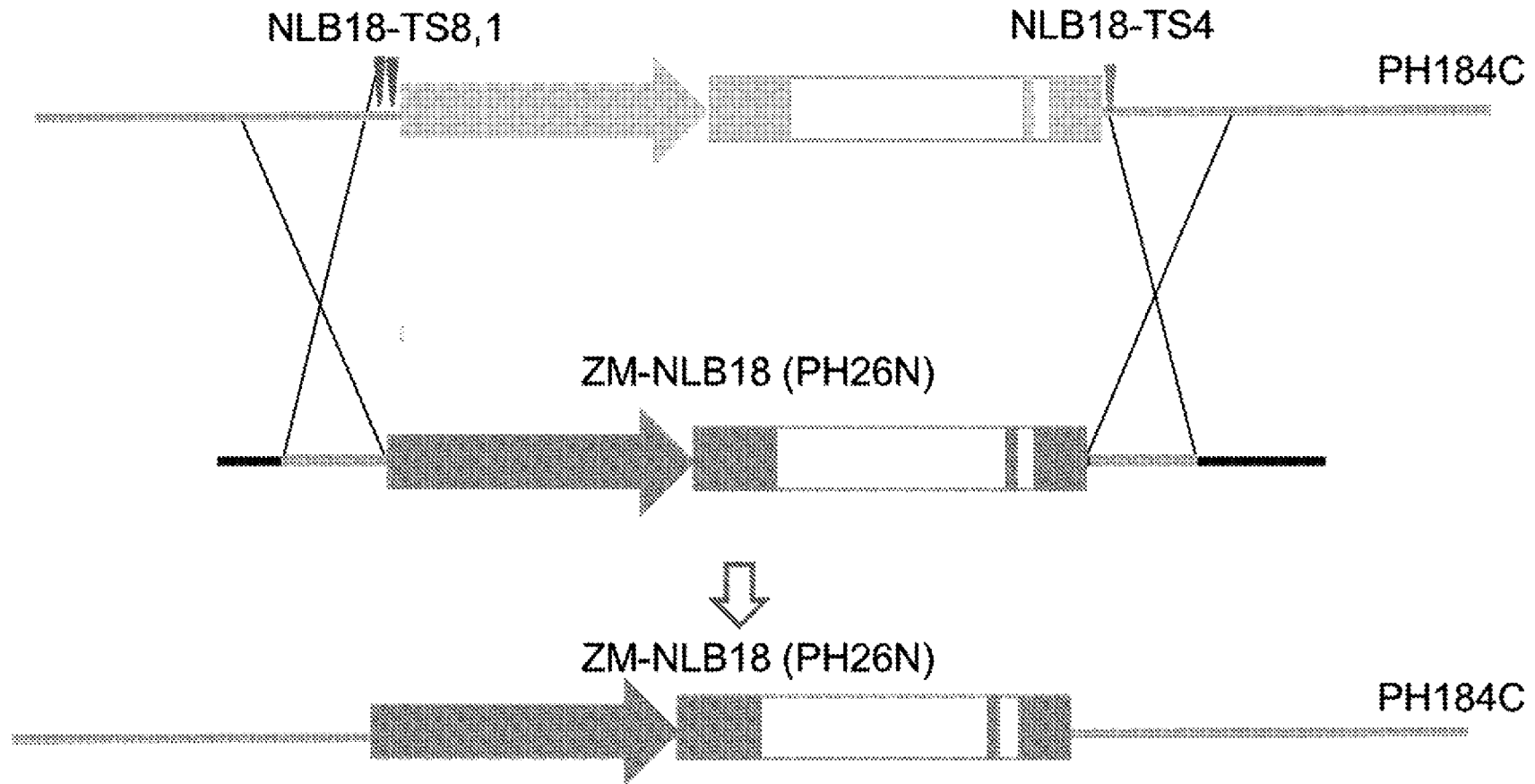
Фиг. 3



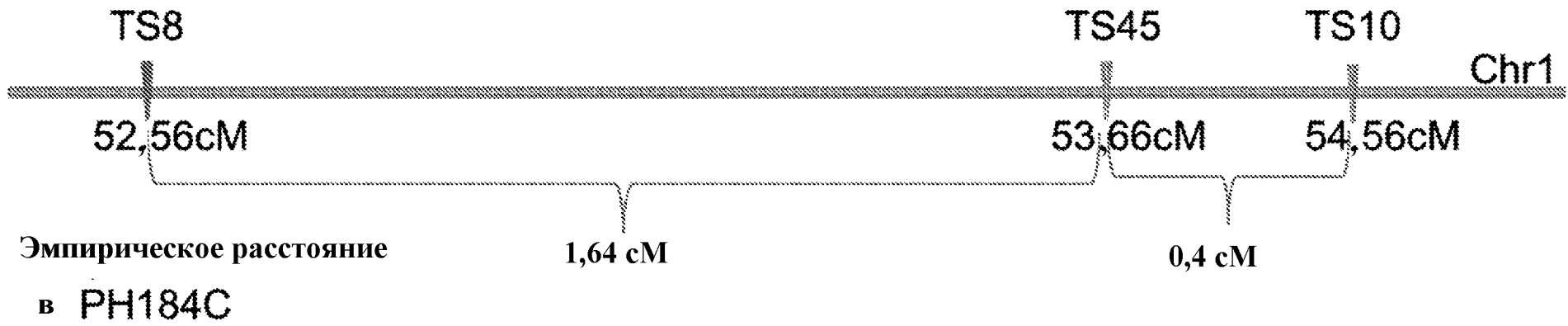
Фиг. 4



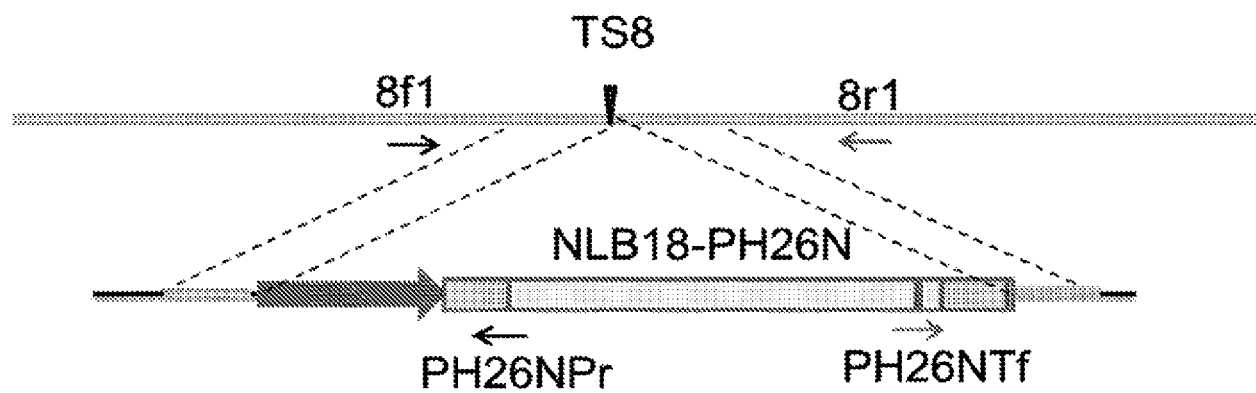
Фиг. 5



Фиг. 6



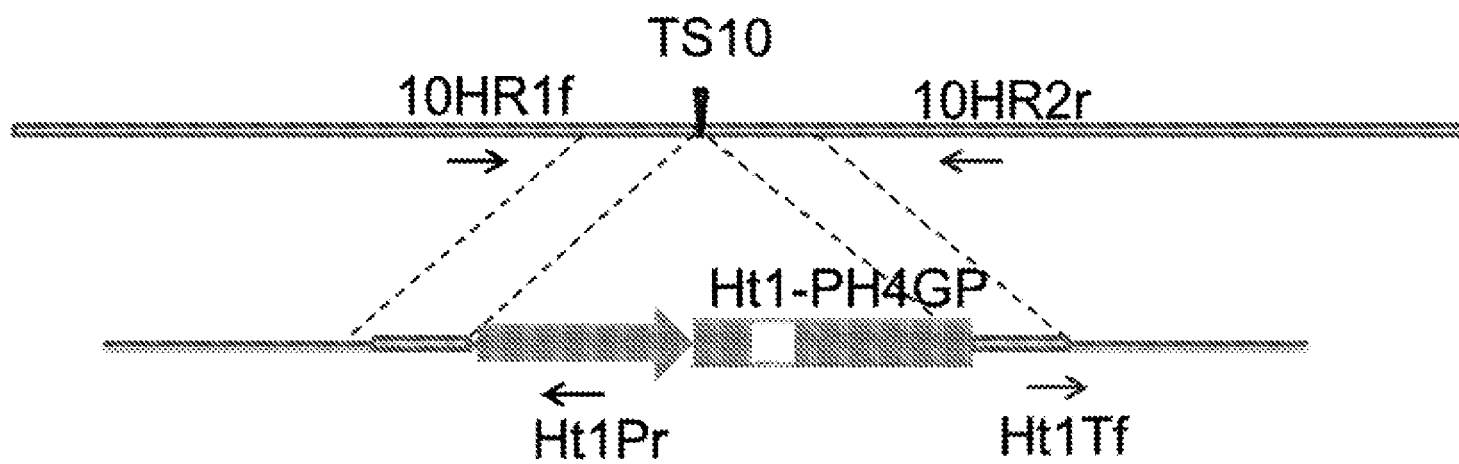
Фиг. 7



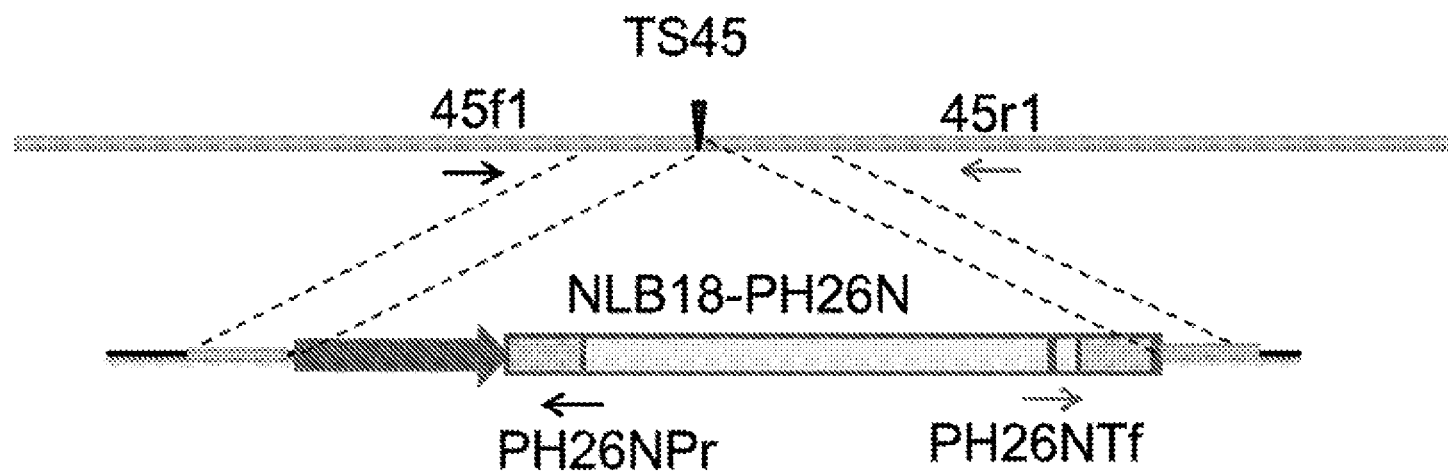
Участок границы сплайсинга HR1: 8f1/PH26NPr

Участок границы сплайсинга HR2: PH26NTf/8r1

Фиг. 8

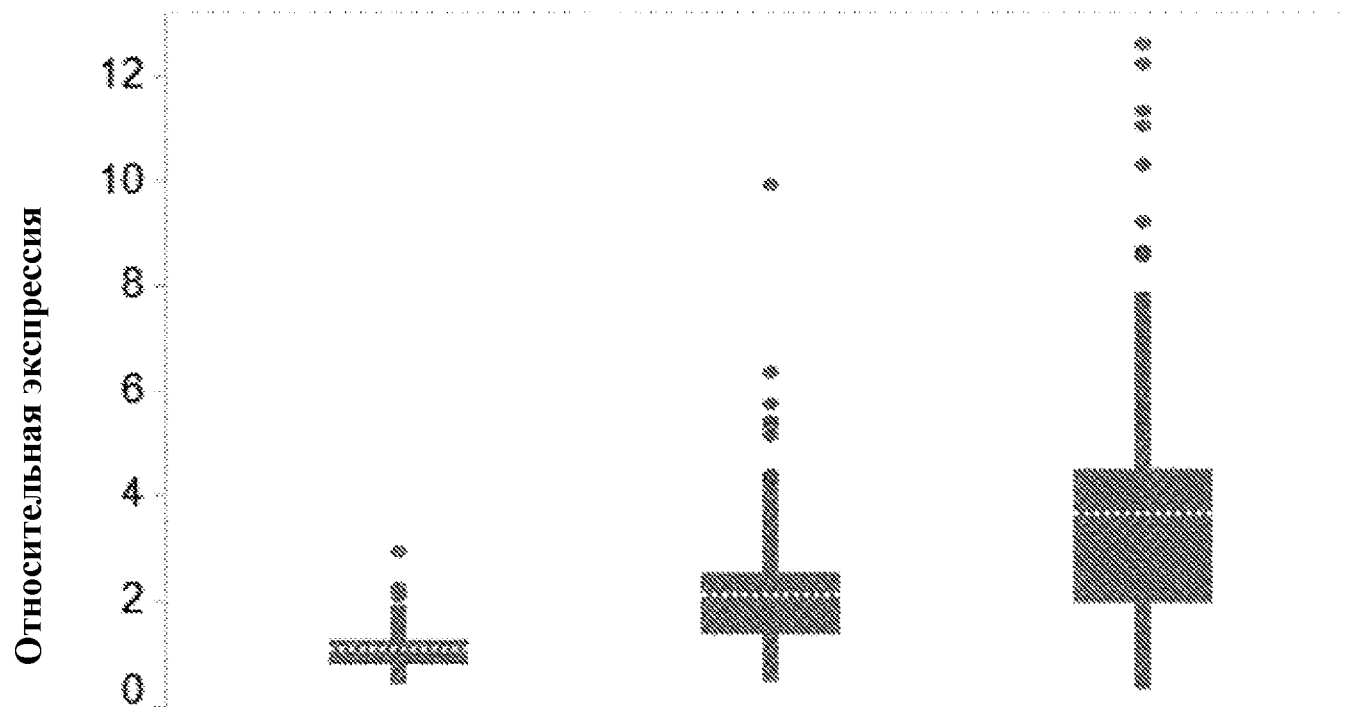


Фиг. 9



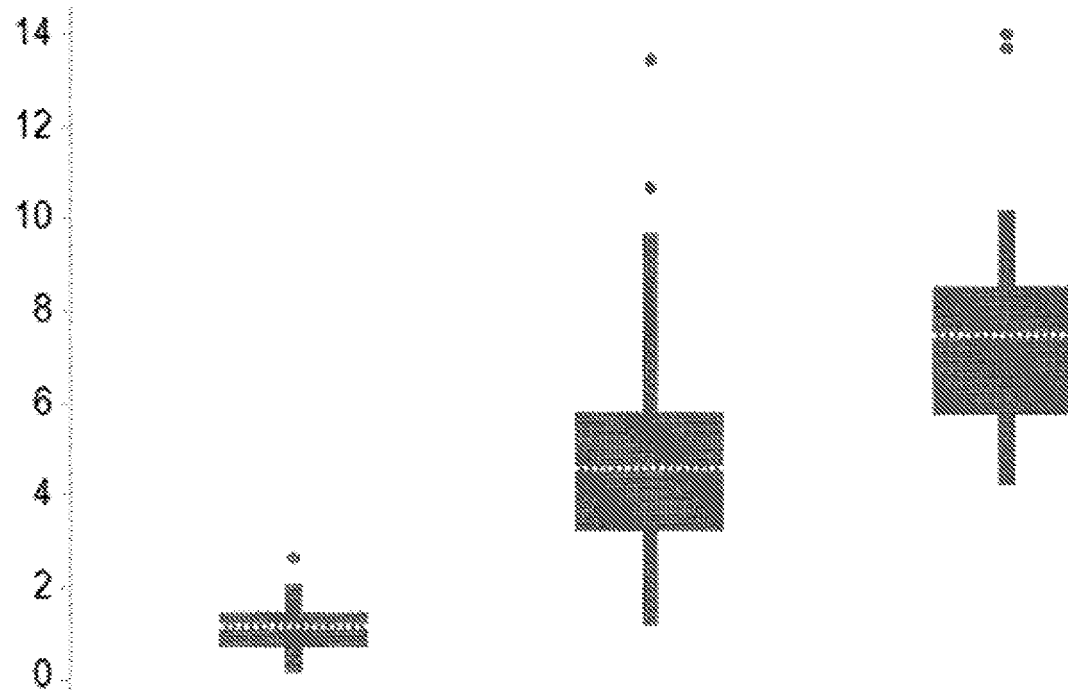


Фиг. 10



	Ноль	Геми	Гомо
Импульс	113	210	106
Выпадающие	3	10	9
Средн.	1,06	2,09	3,66
Срединное	1,03	1,87	2,66

Фиг. 11



	Ноль	Гемини	Гомо
Импульс	27	62	26
Выпадающие	1	2	2
Средн.	1,17	4,59	7,43
Срединное	1,16	3,95	6,99

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202292659**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

*A01H 1/04 (2006.01)*  
*C12N 15/82 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
A01H 1/00, 1/04, C12N 15/82

Электронная база данных, использованная при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
EAPATIS, Espacenet, Patentscope, RUPTO, USPTO, PubMed, NCBI BLAST+, EMBL-EBI, Google, Lens.org

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO2017066597 A1 (PIONEER HI BRED INT) 2017-04-20 / EA201890380A, 2018-11-30 Реферат, с. 9,10, 21-24, примеры 1- 4, формула, SEQ ID NO: 1-4, 9, 11, 12	1-4, 8-10, 13, 14 18-23, 25, 26, 29
X	WO2011163590 A1 (DU PONT et al.) 2011-12-29 с. 3, 66, примеры 2, 3, формула, SEQ ID NO: 95, 97	13,14,18-23, 27, 29
Y		1-12, 15-17, 24
X	WO2015032494 A2 (KWS SAAT AG et al.) 2015-03-12/ EA201690508A, 2016-11-30 с. 27-38, формула, SEQ ID NO: 2	1-5, 13, 14, 19-23, 27, 29
Y		6-12, 15-18, 24-26
X	HURNI S. et al. The maize disease resistance gene Htn1 against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. PNAS, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2015-07-14, Vol. 112, no. 28, pages 8780 – 8785 Реферат	22, 23, 29
Y	WO2016/040030 A1(DU PONT; PIONEER HI BRED INT) 2016-03-17 Реферат, примеры, SEQ ID NO: 26, 36, 37	3, 6, 7, 11, 12, 15-17, 24

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

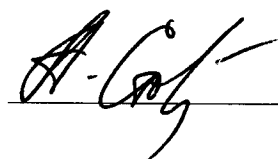
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **06/02/2023**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы  
Начальник отдела химии и медицины



A.V. Чебан

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

**202292659**

**Раздел I. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ, КОГДА НЕКОТОРЫЕ ПУНКТЫ ФОРМУЛЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ НЕ ПОДЛЕЖАТ ПОИСКУ**

Настоящий отчет о патентном поиске не охватывает некоторые пункты формулы изобретения по следующим причинам:

1.  пункты формулы изобретения №:  
т.к. они относятся к объектам, указанным в правиле 3(3) Патентной инструкции к ЕАПК, а именно:
  
2.  пункты формулы изобретения №:  
т.к. они относятся к части евразийской заявки, которая не отвечает установленным требованиям в такой степени, что по ней невозможно провести полноценный патентный поиск, а именно:

**Раздел II. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ НЕСОБЛЮДЕНИЯ ЕДИНСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Единство изобретения не соблюдено по следующим причинам:

Представленная формула изобретения содержит следующие группы изобретений, не связанных между собой единым изобретательским замыслом:

1. Изобретения по пп. 1-12(полностью), 19-21(частично) формулы относятся к способам получения растительной клетки, включающим введение сайт-специфической модификации в эндогенную нуклеотидную последовательность Ht1.

2. Изобретения по пп. 13-18(полностью), 19-21(частично) формулы относятся к способам получения растительной клетки с повышенной устойчивостью к северной пятнистости листьев, включающему введение сайт-специфической модификации в целевой сайт геномного локуса растительной клетки. При этом сайт-специфичные модификации в целевом сайте геномного локуса включают введение любых нуклеотидных последовательностей, которые придают повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, фланкированных 300-500 п.о. нуклеотидных последовательностей, расположенных 5' или 3' относительно соответствующих целевых сайтов. Указанные признаки являются известными из уровня техники (см. документы в отчёте). В этой связи между способом по п. 13 и способом по п. 1 формулы отсутствуют особые технические признаки, определяющие вклад в уровень техники каждым из заявленных изобретений. Поэтому между изобретениями по пп. 1-12 и по пп. 13-18 отсутствует единый изобретательский замысел.

3. Изобретения по пп. 22-29 формулы относятся к растениям, содержащим геномный локус, в котором находится, по меньшей мере, одна нуклеотидная последовательность, придающая повышенную устойчивость к северной пятнистости листьев, и являющаяся гетерологичной по отношению к геномному локусу. Указанные растения не ограничиваются целевым геномным локусом, указанным в п. 1 формулы и охватывает любые нуклеотидные последовательности, придающие устойчивость к северной пятнистости листьев. Кроме того, приведенные в п. 22 формулы признаки являются известными из уровня техники (см. документы в отчёте). В этой связи между изобретениями по пп. 22-29 и способом по п. 1 формулы также отсутствуют особые технические признаки, которые определяют вклад в уровень техники каждым из заявленных изобретений. Поэтому указанные изобретения не образуют единый изобретательский замысел с изобретениями групп 1 и 2.

Таким образом, представленная формула не соответствует требованию правила 4 Инструкции в отношении единства группы изобретений.