

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 3월 19일 (19.03.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/055084 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/82 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/011677

(22) 국제출원일: 2019년 9월 10일 (10.09.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0108026 2018년 9월 11일 (11.09.2018) KR

(71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 김재연 (KIM, Jae Yean); 52704 경상남도 진주시 새평거리 75, 406동 804호, Gyeongsangnam-do (KR). 부티엔반 (VU, Tien Van); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 김지해 (KIM, Jihae); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 정세정 (JEONG, Se Jeong); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 김현정 (KIM, Hyun Jeong); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 박서진 (PARK, Seo-Jin); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 트란밀

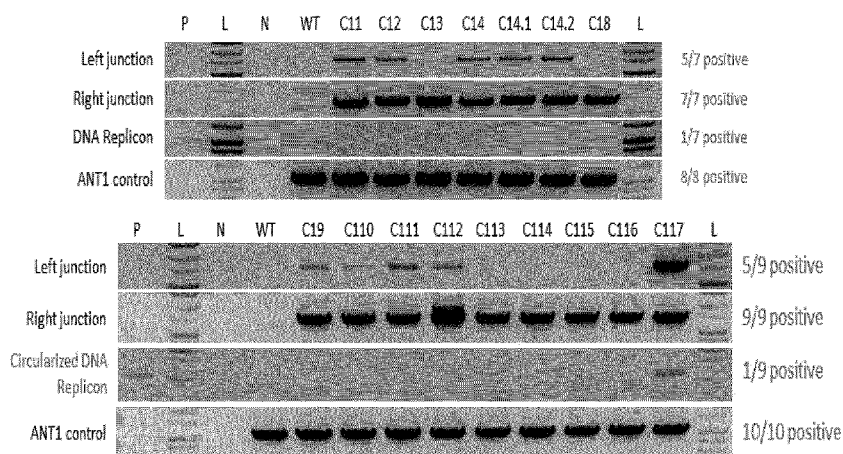
티 (TRAN, Mil Thi); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 시반칼리아니벨루 (SIVANKALYANI, Velu); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 성연우 (SUNG, Yeon Woo); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 도안티 하이 드영 (DOAN, Thi Hai Duong); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호, Gyeongsangnam-do (KR). 프라마니크디브야조티 (PRAMANIK, Dibyajyoti); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호, Gyeongsangnam-do (KR). 쉘케 마하데브 라홀 (SHELAKHE, Mahadev Rahul); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호, Gyeongsangnam-do (KR). 손건희 (SON, Geon Hui); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: VIRUS-BASED REPLICON FOR EDITING GENOME WITHOUT INSERTING REPLICON INTO PLANT GENOME, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 식물체의 게놈에 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 바이러스 기반의 레플리콘 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: a recombinant vector for editing a genome without inserting a replicon into the genome in a T₀ generation plant, comprising a geminivirus-based replicon between left border (LB) and right border (RB) sequences of a Ti plasmid; and a method for editing a genome without inserting a replicon into the genome in a T₀ generation plant, comprising a step of transforming plant cells by inserting a foreign gene into the recombinant vector.

(57) 요약서: 본 발명은 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에 게미니바이러스(geminivirus) 기반 레플리콘(replicon)을 포함하는 T₀ 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 T₀ 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하는 방법에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/055084 A1

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 식물체의 게놈에 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 바이러스 기반의 레플리콘 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 식물체의 게놈에 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 바이러스 기반의 레플리콘 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 식물체를 대상으로 하는 유전자가위 기술은 첨단 신육종 기술로서, 최종 산물에 유전자/게놈 교정에 사용된 유전자가위 등의 외부 유전자가 모두 제거되고 내부 게놈 염기서열에 변화를 일으키는 기술이다. Cas9(CRISPR associated protein 9) 등의 게놈(유전체) 편집 부품을 주로 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 기반 형질전환을 통해 발현시키는데 이 경우 T_0 또는 T_1 세대에서 식물체의 게놈에 T-DNA가 삽입되어 유전자 교정을 일으킨다. 이후 T_1 또는 T_2 세대에서 유전적인 분리를 통해 T-DNA가 삽입되지 않은 유전체 교정 식물이 선택된다.
- [3] 본 발명은 식물 유전체를 교정함에 있어서, 바이러스 기반의 레플리콘(replicon)을 사용하여 레플리콘이 식물체의 유전체에 삽입되지 않고 유전체 교정을 한 후 세포에서 제거되어 T_0 세대에서 선발된 이벤트에서 이미 레플리콘을 포함하지 않게 하는 기술이다. 이 기술에 사용된 레플리콘은 Bean Yellow Dwarf virus 기반의 레플리콘(쌍떡잎 식물용)과 Maize Streak virus 기반의 레플리콘(외떡잎 식물용)이 사용되었다. 본 발명의 레플리콘을 사용하면 유성생식(종자번식)이 아닌 영양생식(vegetative reproduction) 작물에서 효과적으로 유전체 교정이 가능한 장점이 있다. 일반적으로 T_1 세대에서 멘델의 분리법칙을 통해 유전자가위를 제거하는 방식은 유성생식 작물의 경우에 활용가능하나 영양생식 작물의 경우에 유전자가위를 제거하는 것이 불가능하나, 본 발명의 레플리콘을 이용하면 영양생식 작물에서 효과적으로 유전체 교정이 가능할 것이다. 또한 본 리플리콘 벡터시스템을 사용하여 T_0 세대에서 바로 유전체 교정이 일어났으나 외부 유전자가 삽입되지 않은 이벤트를 확보하면, 기존 T_1 또는 T_2 에서 이런 이벤트를 얻는 것보다 빠르게 신육종이 진행될 수 있다. 또한 식물체의 게놈에 외부 유전자가 전혀 삽입되지 않은 상태에서 일시적으로 발현하는 유전자가위에 의해 유전자 교정이 일어남으로 프로세스 상태에서도 기존 유전자가위 기술과 다르게 Non-GMO 방식을 사용한다고 볼 수 있어 규제 통과에 효과적일 것이다.
- [4] 한편, 한국공개특허 제2017-0081268호에는 담배 얼룩 바이러스(TRV) 서열과 대상 게놈의 타겟 서열에 서열 특이적인 절단을 매개하는 단일한 가이드 RNA(sgRNA)를 코딩하는 핵산 서열 구조체를 포함하는 식물세포 및 이의

유전자 편집 용도에 관한 '게놈 편집용 핵산 구조체'가 개시되어 있으나, 본 발명의 식물체의 게놈에 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 바이러스 기반의 레플리콘 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 게미니바이러스 기반의 레플리콘을 이용하여 식물체에 유전체 교정을 수행한 결과, T_0 이벤트 식물체에서 유전체의 교정은 일어났으나, 레플리콘이 식물체 게놈 내에 전혀 삽입되지 않았음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [6] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에 게미니바이러스(geminivirus) 기반 레플리콘(replicon)을 포함하는 T_0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 재조합 벡터를 제공한다.
- [7] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 T_0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하는 방법을 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 T_0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [9] 본 발명은 식물 유전체를 교정함에 있어 식물체 플라스미드 형태인 바이러스 기반 레플리콘을 사용하는 시스템으로 본 발명에 사용된 레플리콘은 식물체의 유전체에 삽입되지 않고 T_0 세대에서 사라짐으로써 육종 과정을 짧게 할 수 있고, 식물 유전체에 외부 유전자의 삽입이 일어나지 않는 non-GMO 방식의 기술이다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 Bean Yellow Dwarf virus(BeYDV) 기반 pLSL.R.Ly 벡터(Golden Gate Level 2 vector)의 벡터 맵이다.
- [11] 도 2는 pLSL.R.Ly 벡터의 T-DNA 모식도와 LIR-Rep/RepA-SIR 염기서열을 보여주는 도면이다.
- [12] 도 3은 Maize Streak virus(MSV) 기반의 레플리콘(pMSV0)의 모식도이다. Rep/RepA 코딩 DNA 부분은 intron이 작동하지 않을 경우 RepA가 짧은 ORF로 코딩되고, intron이 잘려 뒷부분이 엑손으로 작동하면 긴 ORF로 Rep 단백질이 생성된다. 단백질 코딩 ORF는 reverse 서열로 표시되어 있다.
- [13] 도 4는 pLSL.R.Ly 벡터를 사용하여 유전체 교정을 시도한 토마토 T_0 식물체의 유전체 교정 여부(상동재조합 여부)와 레플리콘의 존재 여부를 확인한 결과이다.

- [14] 도 5는 pContorol 2.6(8161.1)의 벡터 맵이다.
 [15] 도 6은 pContorol 2.6(8161.1) 벡터로부터 빠져나온 레플리콘의 맵이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [16] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에 게미니바이러스(geminivirus) 기반 레플리콘(replicon)을 포함하는 T₀ 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 재조합 벡터를 제공한다.
- [17] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 것을 의미한다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [18] 용어 "벡터"는 DNA 단편(들), 유전자 분자를 세포 내로 전달할 수 있는 수단을 지칭할 때 사용된다. 벡터는 숙주세포에서 독립적으로 DNA를 복제시키고, 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 유전자 서열을 포함하는 재조합 벡터를 의미한다. 재조합 벡터는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스 벡터, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 게미니바이러스는 BeYDV(Bean Yellow Dwarf virus) 또는 MSV(Maize Streak virus)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 BeYDV는 쌍떡잎 식물용 레플리콘 제작을 위해 사용된 것이며, MSV는 외떡잎 식물용 레플리콘 제작을 위해 사용된 것이다.
- [20] 본 발명에 따른 재조합 벡터에서, 상기 레플리콘은 LIR(long intergenic region); 프로모터; Rep/RepA 단백질 코딩 서열; 터미네이터; SIR(short intergenic region); 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입할 수 있는 MCS(multiple cloning site); SIR; 및 LIR이 순차적으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [21] 바이러스의 LIR(long intergenic region)은 복제원점 및 프로모터와 같은 기능을 가지고 있고, SIR(short intergenic region)은 터미네이터와 같은 기능을 가지고 있다.
- [22] 일반적으로 레플리콘의 크기가 작으면 카피 수가 많아지고, 상동재조합의 확률은 주형(template)의 카피 수가 많아질수록 확률이 증가하므로, 다양한 인자들을 고려하여 레플리콘의 구성을 조절할 수 있다.

- [23] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 레플리콘은 BeYDV 기반 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 레플리콘 또는 MSV 기반 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 레플리콘일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [24] 용어 "레플리콘(replicon)"은 자율적 제어를 하는 복제단위를 의미하는 것으로, 복제단위는 연속된 DNA 분자로, 복제는 분자 내의 특정부위에서 개시하여 축차적으로 진행하여 종결한다. 플라스미드, 바이러스의 DNA 및 세균의 염색체는 모두가 1개의 복제단위이다.
- [25] Baltes 등(2014, Plant Cell 26(1):151-163)은 기존에 DSB(double strand break)를 유도하는 ZFN(Zinc Finger Nuclease)과 게미니바이러스 기반의 바이러스 레플리콘을 사용하여 HR(homologous recombination) 주형을 증폭시킴으로써 담배 식물에서 HR 효율이 획기적으로 증가함을 보여주었다. ZFN과 HR 주형을 포함하는 게미니바이러스 레플리콘은 T-DNA에 탑재되었고 아그로박테리움을 통해 담배에 주입된 후, 롤링 서클 복제를 통해 원형의 레플리콘을 만들고 ZFN을 발현시켜 결합있는 GUS 표적 유전자에 DSB를 유도하면 레플리콘에 탑재된 HR 주형에 의해 HR이 일어나게 되는 것이다.
- [26] 본 발명의 레플리콘에서, 상기 MCS는 제한효소 *BsmBI*, *AarI* 또는 *BpiI*로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 *BsmBI*, *AarI* 또는 *BpiI*는 골든 게이트 클로닝을 위한 타입 IIs 제한효소이다.
- [27] 바이러스 기반의 레플리콘을 이용한 유전체 교정은 상동재조합(homologous recombination) 기전을 통해 유전체의 교정이 가능할 수 있다.
- [28] 본 발명에 따른 상기 MCS에는 유전체 교정을 위한 주형 DNA 서열을 클로닝할 수 있고, 또는 유전체 교정을 위한 주형 DNA 서열; Cas9(CRISPR associated protein 9), Cpf1(CRISPR from Prevotella and Francisella 1), TALEN(Transcription activator-like effector nuclease), ZFN(Zinc Finger Nuclease) 또는 이의 기능적 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 핵산가수분해효소 코딩 서열; 및 상기 핵산가수분해효소를 편집하고자 하는 표적 게놈 자리로 유도할 수 있는 가이드 RNA 등을 클로닝할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [29] 본 발명자는 Cas9 또는 Cpf1의 차이에 따른 상동재조합 효율을 비교한 결과, Cpf1이 Cas9 보다 상동재조합 이벤트 효율이 높음을 확인하였다.
- [30] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 T₀ 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하는 방법을 제공한다.
- [31] 본 발명의 재조합 벡터는 전술한 것과 같으며, 유전체 교정이 일어난 T₀ 이벤트에서 레플리콘이 세포로부터 제거되어, 유성생식이 아닌 영양생식 작물에서도 효과적으로 유전체 교정이 가능함을 알 수 있었다.
- [32] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 레플리콘은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [33] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 T₀ 세대

식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은, 그 자체는 식물체의 게놈 내로 삽입되지 않으면서 표적하는 유전자의 교정 이벤트가 가능한 바이러스 기반의 레플리콘을 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하고 있어, T_0 세대 식물체에서 레플리콘의 게놈 내 삽입 없이 원하는 유전자의 교정만 일어나게 된다.

[34] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[35] 재료 및 방법

[36] 1. 실험 재료

[37] 본 발명에 사용된 재료는 하기 표 1과 같다.

[38]

[표1]

본 발명에 사용된 실험 재료, 시약 및 도구

명칭	출처
식물체	
Tomato variety Cultivar <i>Hongkwang</i>	지역 회사
박테리아	
<i>Escherichia coli</i> 10-beta	NEB, 미국
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101::pMP90	경상대학교, 한국
DNA 벡터	
pTC147	Addgene, 미국
pTC217	Addgene, 미국
pContorol 2.6(8161.1)	실험실 보유 벡터
Golden Gate too kit	Addgene, 미국
MoClo Tool kit	Addgene, 미국
시약	
dNTPs	ThermoFisher Scientific, 미국
Phusion <i>Taq</i> DNA polynerease	ThermoFisher Scientific, 미국
<i>Pfu</i> DNA polymerase	ThermoFisher Scientific, 미국
T4 DNA ligase	NEB, 미국
Restriction enzymes(<i>BpiI</i> , <i>BsaI</i> and others)	NEB, 미국
T7E1 endonuclease	NEB, 미국
Plant hormones; Acetosyringone; Hydrocarbon; β -D Glucuronide (X-Gluc); Chemicals for plant tissue culture; MS salts and vitamins; MS salts and B5 vitamins, PhytoAgar, Maltose.	Sigma, 미국; DUCHEFA Biochemie B.V., 네덜란드
물	Treated with Millipore system
키트	
CloneJET™ PCR cloning	ThermoFisher Scientific, 미국
Plasmid DNA isolation kit (mini and midi)	BIOFACT, 한국; Qiagen, 독일
Total genomic DNA isolation kit (mini preps)	Qiagen, 독일

[39] 2. 클로닝

[40] 2.1 PCR을 이용한 DNA 단편 증폭

[41] 제조사의 프로토콜에 따라 Phusion *Taq* 중합효소(high fidelity)를 이용하여, 특이적 프라이머(최종 농도 0.4 μ M), dNTPs(최종 농도 0.2mM) 및 주형(게노믹 DNA의 10~20ng, 또는 정제된 DNA의 0.1~0.5ng/reaction)을 혼합하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 물은 전기전도도가 2 μ S/cm 보다 작으면서, DNase, RNase 및 protease가 없는 것을 사용하였다. PCR 산물은 0.8% 아가로스 겔에 로딩하여 확인하였으며, 예상되는 크기의 밴드 부분의 겔을 절제하여 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)을 사용하여 정제하였다. PCR 산물의 농도는 Nanodrop 2.0(ThermoFisher Scientific)을 사용하여 측정하였다.

[42] 2.2 골든 게이트 digestion-ligation 셋업

[43] 골든 게이트 어셈블리를 위한 효소 처리(digestion) 및 라이게이션(ligation)의 조건은 하기 표 2와 같이 설정하였다.

[44] [표2]

Digestion-Ligation 조건

요소	필요양 (fmol)	1×
10×T4 DNA buffer		1.5
insert	20	x
Vector	13	y
T4 DNA ligase		0.5
<i>Bsa</i> I or <i>Bpi</i> I or <i>Bsm</i> BI		0.5
H ₂ O		up to 15
Total		15 (μ l)

[45] *Bsa*I 또는 *Bpi*I를 이용한 경우의 유전자증폭 반응 프로그램은 하기 표 3과 같으며, *Bsm*BI를 이용한 경우의 유전자증폭 반응 프로그램은 표 4와 같다.

[46] [표3]

증폭 반응 조건(*Bsa*I 또는 *Bpi*I)

단계	온도(°C)	시간(분)	반복 횟수	설명
1	37	15	1	Pre-digestion
2	37	2	25-40	Digestion-ligation
	16	5		
3	37	5	1	Post-digestion
4	50	5	1	Post-digestion
5	80	5	1	Denaturation

[47] [표4]

증폭 반응 조건(*BsmBI*)

단계	온도(°C)	시간(분)	반복 횟수	설명
1	42	15	1	Pre-digestion
2	42	2	25-40	Digestion-ligation
	16	5		
3	42	5	1	Post-digestion
4	50	5	1	Post-digestion
5	80	5	1	Denaturation

[48] 2.3 대장균 형질전환

[49] Digestion-ligation 혼합물을 대장균 10β 균주로 형질전환한 후, 형질전환된 대장균과 XGAL(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, 20mg/ml) 15μl를 125mg/L의 카르베니실린(Carbenicillin) 또는 암피실린을 포함하는 LB 고체배지에 도말하고, 하룻밤 배양한 후 양성의 하얀색 콜로니를 확인하였다.

[50] 콜로니 내 컨스트럭트의 비율을 확인하기 위해, 각 컨스트럭트 별로 하얀색 콜로니를 50mg/L의 스트렙토마이신을 포함하는 LB 액체배지(레벨 0 클로닝 확인용), 125mg/L의 카르베니실린을 포함하는 LB 액체배지(레벨 1 클로닝 확인용) 또는 50mg/L의 카나마이신을 포함하는 LB 액체배지(레벨 2 또는 3 클로닝 확인용)에 접종하여 배양한 후, 플라스미드를 분리하여 적절한 제한효소로 처리하였다. 예상되는 크기의 절단된 크기를 보이는 플라스미드를 포함하는 콜로니들을 각각의 양성 클론으로 분류하였다.

[51] 2.4 시퀀싱

[52] 각 컨스트럭트 당 2개의 양성 클론을 솔젠트(한국)에 의뢰하여 시퀀싱 분석하였다. 시퀀싱 결과를 분석하고 차후 클로닝 단계를 수행하였다.

[53] **3. BeYDV(Bean Yellow Mosaic Virus) 기반의 레플리콘 수용체 벡터 제작**

[54] LIR-SIR-LIR 내에, 발현되도록 조정된 Rep/RepA를 가진 BeYDV 레플리콘을 포함하는 레벨 2 벡터를 제작하기 위해서(골든 게이트 레벨 2 수용체로 벡터를 사용할 수 있도록), *BpiI* 클로닝 자리(TGCC..GGGA)를 LIR-SIR와 LIR 사이에 삽입하였다. LIR과 SIR은 pLSLR 벡터로부터 클로닝하여 사용하였다.

[55] SIR-LIR 사이에 *BsaI* 클로닝 자리를 가진 LIR-SIR-LIR을 포함하는 벡터인 pLSL의 클로닝 반응을 위해, 하기의 DNA 단편을, 부착말단의 생성을 위해 *BpiI* I를 사용하여 순차적으로 어셈블하였고, T4 DNA 리가제를 사용하여 연결시켰다:

[56] a) PCR product: *BpiI*(TGCC)-LIR-SIR-(TGCC) *BsaI*.(GCAA) *BpiI*

[57] b) PCR product: *BpiI*(GCAA). *BsaI*(GGGA)-LIR- *BpiI*(ACTA)

- [58] c) pICH41744 end linker vector: *BpiI*(ACTA)-L3E-(GGGA) *BpiI*
- [59] d) Level 2 acceptor: pAGM4673 or pAGM4723 (TGCC..GGGA).
- [60] 그 후, LIR-SIR 사이에 MCS(multicloning site)를 포함하는 pLSL.MCS1의 클로닝을 위해, 하기의 DNA 단편을 pLSL 벡터의 MCS1 자리에 인테그레이션(integration)시켜 연결시켰다:
- [61] a) *AscI* 및 *BstXI*에 의해 절단된 pLSL.
- [62] b) MCS1(MCSf1 및 MCSr1을 혼합하고 어닐링).
- [63] 그 후, pLSL.MCS1에 클로닝 마커로서 라이코펜 발현 카세트를 도입한 벡터(pLSL.Ly)를 제작하기 위해 하기의 DNA 단편을 연결시켰다:
- [64] a) *BpiI*에 의해 절단된 pLSL.MCS1.
- [65] b) *BpiI*에 의해 절단된 pAGM4723 및 분리된 라이코펜 단편.
- [66] 그 후, LIR의 조절 하에 Rep/RepA 코딩 서열이 클로닝된 pLSL.R.Ly 벡터의 클로닝을 위해 하기의 DNA 단편을 레플리콘 내에 연결시켰다:
- [67] a) *BsaI*에 의해 절단된 pLSL.Ly.
- [68] b) RRA-F4/RRA-R4 프라이머에 의해 생성된 Rep/RepA PCR 산물.
- [69] 상기와 같이 제조한 pLSL.R.Ly 벡터(도 1 및 도 2)에서 라이코펜 생산에 관련된 유전자(Ly)가 제거되고 crRNA, 35S-Cpf1, donor template 등을 포함하는 컨스트럭트를 골든 게이트 어셈블리 방식을 통해 클로닝하여(8161.1 명명), 추후 실험에 사용하였다.
- [70] **4. 토마토 형질전환**
- [71] *In vitro* 조건에서 배양시킨 토마토 홍광 품종 유래의 자엽(cotyledon) 외식편을 본 발명의 컨스트럭트를 포함하고 있는 아그로박테리움을 이용하여 형질전환시켰다. 간단하게, 홍광 품종의 멸균된 종자를 1/2x MSO 배지(2.2g MS salts + B5, 20g sucrose, 0.5g MES (pH=5.7), 7.5g agar for 1L)에서 25±2°C, 16시간 명/8시간 암의 광주기 조건에서 7일간 배양한 후 유묘를 회수하여 자엽 잎을 0.2~0.3cm 크기로 절단한 다음, 각 단편(외식편)을 PREMC 배지(2.2g MS salts + B5, 30g maltose, 0.1g Ascorbic acid, 1.952g MES, 0.2mg IAA (pH=5.5), 7.5g agar for 1L; 상기 혼합물을 멸균한 후, 1.0mg Zeatin trans-isomer, 1mℓ Putrescine(1mM), acetosyringone(AS) 100 μM 첨가)를 포함하는 평판배지에 1시간 동안 올려 전처리시켰다. 전처리된 외식편을 작은 구멍이 나도록 찌른 후 본 발명의 컨스트럭트를 포함하고 있는 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101::pMP90 균주를 사용하여 상온에서 20분간 반응시켜 형질전환시켰다. 형질전환에 사용된 아그로박테리움 GV3101::pMP90 균주는 적절한 항생제를 포함하는 LB 배지, 30°C에서 교반시키며 하룻밤 일차 배양시킨 후, OD₆₀₀ 값이 0.6~0.8 수준인 배양액으로부터 원심분리를 통해 세포를 회수하였다. 세포 펠릿은 200 μM의 AS를 포함하는 ABM-MS 액체배지로 현탁시킨 후, 토마토 외식편 형질전환에 사용되었다.
- [72] 아그로박테리움으로 형질전환시킨 토마토 외식편은 공배양 배지(ABM-MS

배지, 8g/L agar, 200 μ M AS)로 옮겨 25°C에서 2일간 배양시켰다. 그 후, 외식편을 비-선별 배지(NSEL)로 옮겨 5일간 배양시킨 후, 선별 배지(SEL5)로 옮겨 배양시켰다. 선별 배지에서 형질전환시킨 외식편의 계대배양은 최적의 재생 효율에 이를 때까지 10일 간격으로 수행되었다. 신초가 충분한 길이(1.5~3.0cm)에 이르면, 발근배지로 옮겨 온전한 식물체로 재생되도록 유도하였다. 발근배지로부터 성장한 온전한 식물체를 버미큘라이트 포트에 옮겨 26 $\pm$ 2°C의 온도 및 16시간 명/8시간 암의 광주기를 가진 비닐하우스 내의 토양으로 옮겨지기 전까지 경화시켰다.

[73] [표5]

토마토 외식편 배양에 사용된 배지 조성

AMB (for 1L)	MS (for 1L)	ABM-MS	NSEL (for 1L)	SEL5 (for 1L)
K ₂ HPO ₄ : 2.212 g KH ₂ PO ₄ : 1.130 g NH ₄ NO ₃ : 1.496 g KCl: 0.149 g MgSO ₄ : 0.308 g CaCl ₂ : 0.015 g FeSO ₄ : 0.003 g Glucose: 20 g MES: 3.904 g pH=5.5	MS salts + B5 vitamins: 2.2 g Sucrose: 5 g pH=5.5	Mix ABM and MS as 1:1 ratio. For semisolid ABM-MS, add 8g/L of agar. Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 1.0 mg/L IAA: 0.2 mg/L putrescine (1mM): 1ml AS (200 μ M)	MS salts + B5 vitamins: 4.4 g MES: 0.976 g Maltose: 30 g IAA: 0.2 mg pH = 5.7 Agar: 8 g Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 2.0 mg Kanamycin: 80 mg Timentin: 300 mg Putrescine (1mM): 1ml	MS salts + B5 vitamins: 4.4 g MES: 0.976 g Maltose: 30 g IAA: 0.5 mg pH = 5.7 Agar: 8 g Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 2.0 mg Kanamycin: 80 mg Timentin: 300 mg Putrescine (1mM): 1ml

[74] 5. T₀ 토마토 형질전환체의 분석

[75] 토마토 형질전환체의 잎을 채집하여, 제조사의 프로토콜에 따라 DNeasy Plant mini kit(Qiagen)를 사용하여 총 게놈 DNA를 추출하였다. T₀ 식물체에서 상동재조합 이벤트의 여부는 추출한 gDNA를 주형으로 사용하여 레플리콘의 left 또는 right junction에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR 분석으로 평가하였으며, 환형 DNA의 존재 여부를 통해 레플리콘의 T₀ 이벤트 식물체 내의 존재 유무를 확인하였다. Actin 유전자는 내부 참조 유전자로 사용되었으며, 레플리콘 junction과 상동재조합을 통해 교환된 서열의 확인을 위해 PCR 산물은 생거법으로 서열분석하였다.

[76]

[표6]

레플리콘에 의한 상동재조합 이벤트 유무 및 레플리콘 존재 확인을 위한 PCR 분석에 사용된 프라이머 정보

표적	프라이머	서열정보(5'→3')	부산물 크기
Left junction	UPANT1-F1	TGCGATGATCTACGGTAACAAA (서열번호 4)	1485 bp
	NPTII-R1	GCGTGCAATCCATCTTGTTTC (서열번호 5)	
Right junction	ZY010F	ACGTAAGGGATGACGCACA (서열번호 6)	1380 bp
	TC140R	TACCACCGGTCCATTCCCTA (서열번호 7)	
ANT1 control	TC140F	GGAAAATGGCATCTTGTTCCC (서열번호 8)	1056 bp
	TC140R	TACCACCGGTCCATTCCCTA (서열번호 7)	
Replicon	GR-F1	TTGAGATGAGCACTTGGGATAG (서열번호 9)	557 bp
	pCf.ANT1-R 4	ACCTCAACGACGCAAGTATT (서열번호 10)	

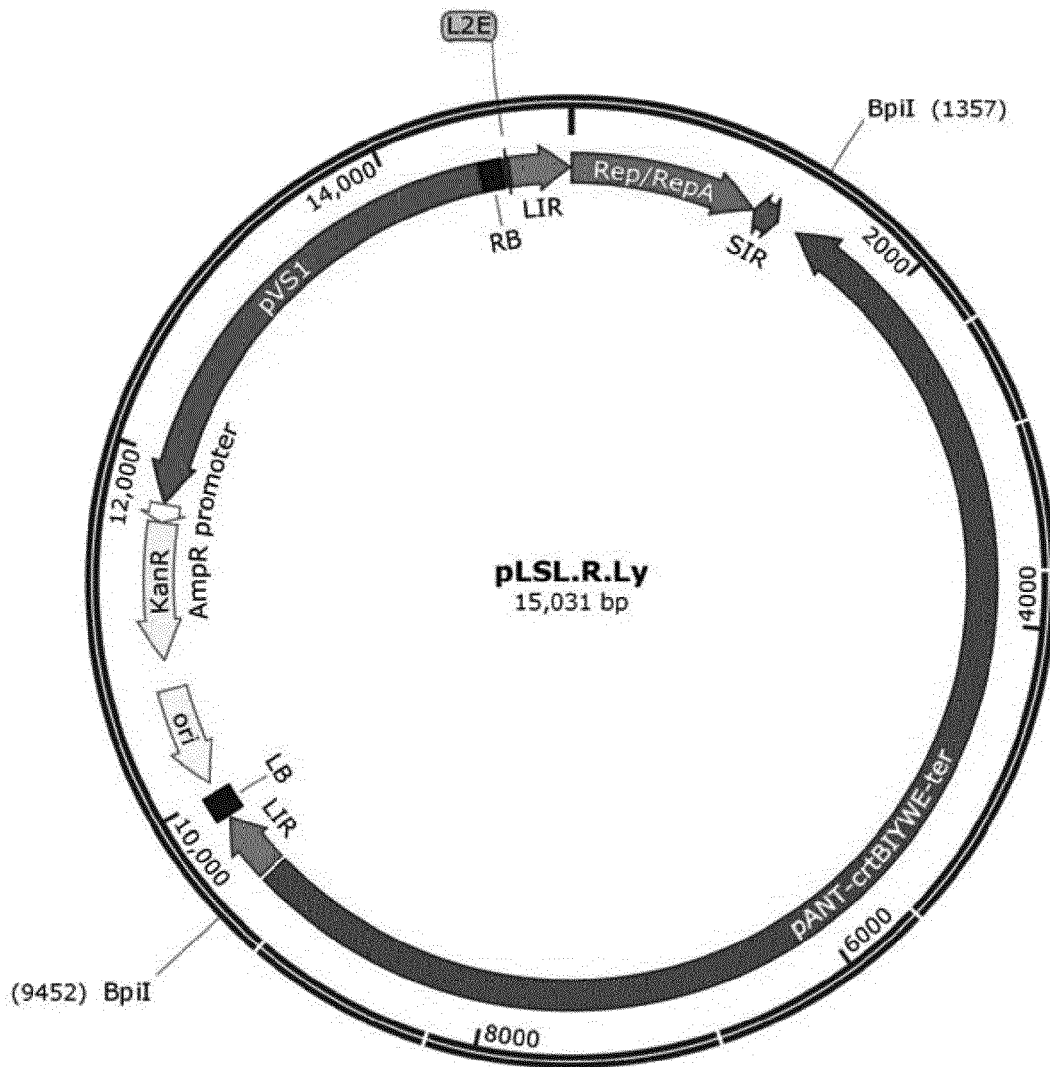
[77] 실시예 1. T₀ 토마토 형질전환체의 레플리콘 존재 여부 확인

[78] 본 발명에 따른 바이러스 기반 레플리콘을 이용한 토마토 식물체의 형질전환 결과, 분석된 T₀ 토마토 식물체 16개 모두에서 right junction에 대한 PCR 증폭 산물이 확인되어, 16개의 식물체 모두 상동재조합이 일어났음을 확인할 수 있었으며, 10개의 식물체에서는 left junction에 대한 PCR 증폭 산물도 확인되어, 10개의 식물체는 완전한 상동재조합이 일어났음을 알 수 있었다. 흥미롭게도, 16개 식물체 중 단 2개의 식물체(C11 및 C117)에서만 환형 DNA가 확인되어, 나머지 14개의 식물체는 형질전환에 사용된 레플리콘이 T₀ 이벤트 식물체의 게놈 내에 삽입되지 않았음을 알 수 있었다(도 4). 즉, 본 발명의 레플리콘을 사용하면 유성생식(종자번식)이 아닌 영양생식 작물에서도 효과적으로 유전체 편집이 가능할 수 있음을 유추할 수 있었다.

청구범위

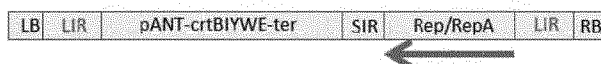
- [청구항 1] Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에 게미니바이러스(geminivirus) 기반 레플리콘(replicon)을 포함하는 T₀ 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 재조합 벡터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 게미니바이러스는 BeYDV(Bean Yellow Dwarf virus) 또는 MSV(Maize Streak virus)인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 레플리콘은 LIR(long intergenic region); 프로모터; Rep/RepA 단백질 코딩 서열; 터미네이터; SIR(short intergenic region); 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입할 수 있는 MCS(multiple cloning site); SIR; 및 LIR이 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 MCS는 제한효소 *BsmBI*, *AarI* 또는 *BpiI*로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 레플리콘은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 T₀ 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하는 방법.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 T₀ 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 조성물.

[도 1]



[도 2]

T-DNA region in pLSL.R.Ly replicon vector

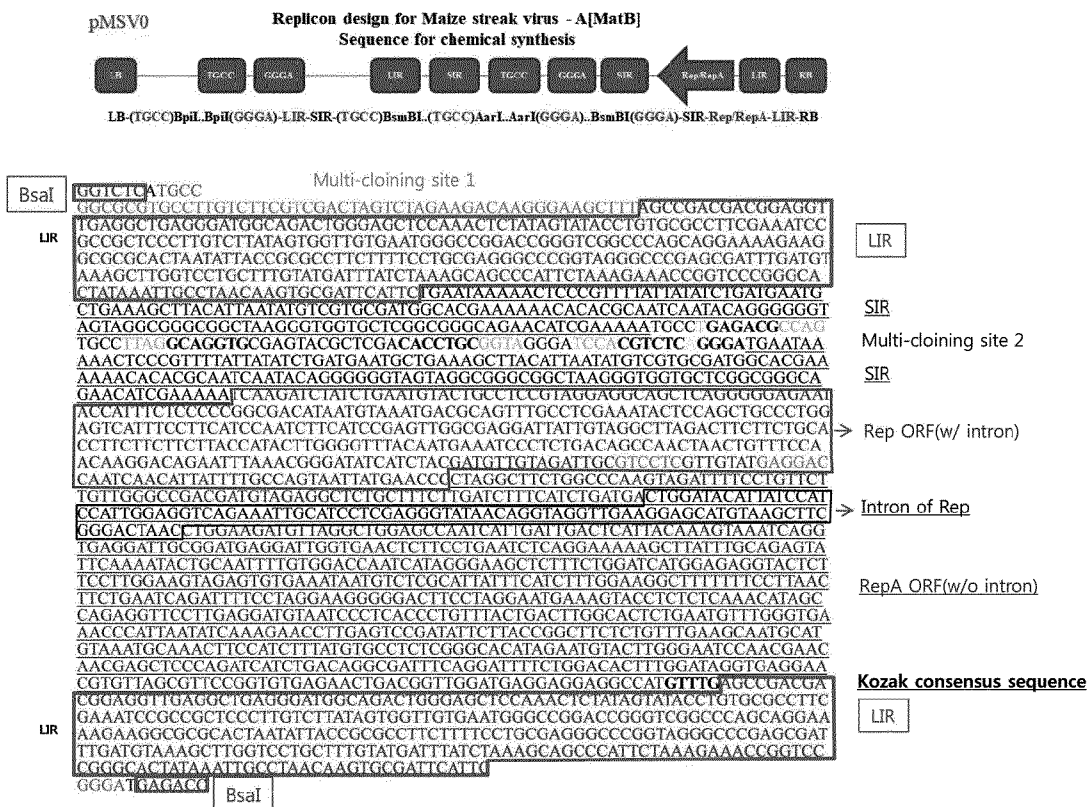


LIR-Rep/RepA-SIR sequence in pLSL.R.Ly replicon vector

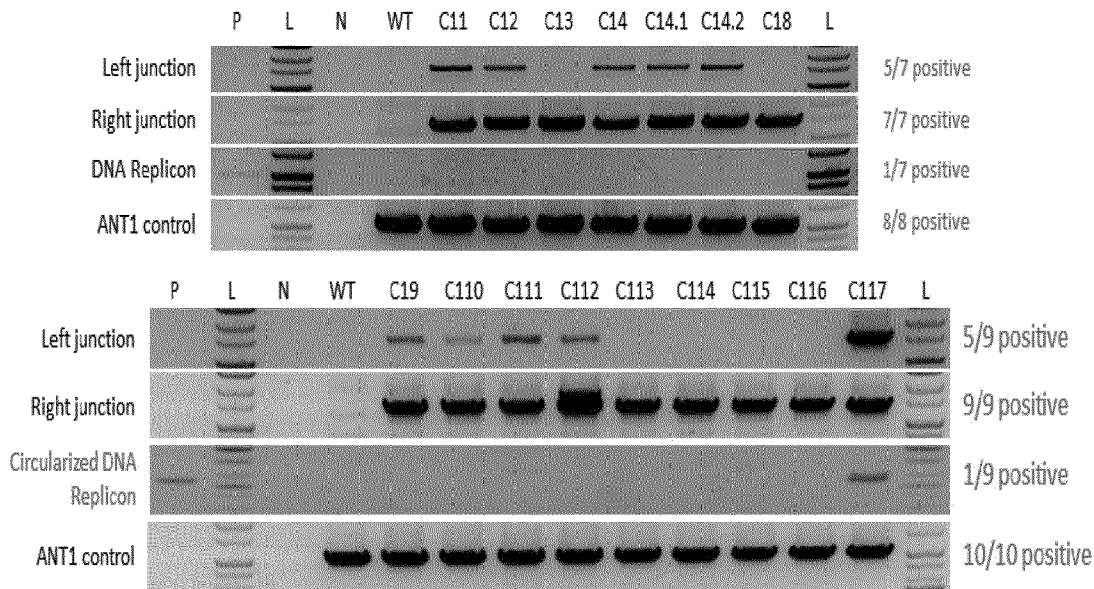
GAGGGTCGTACGAATAATTCGTATCCAACGGAAATACCTGATACAATATACGCTCCATCAAATACCATCACATCGTATATGCTTTTATA LIR
 GTGTGAACACCTTTAACCTAGTGGGCGGGAAATTTTCTACTTTAAATCTGGACCGCTCGTGCTAAAGCACTCGCGATAAGGGGG
 GGCCACGCCGGTAATATAATTCGGCGTGGGCCCCCTTGTGCGAAAGACTTCGTCTTTAAGTAAATCCACGTCATTTTCACT
 ATCTATTAAATTTGACCAAAATACCCCTGCCTCCATGCCCTCACGCGCGGTTATAAGATAGAGTTTGAGGCAACCCCTCGGAGTCACAA N terminal
 CAAC TCCCAAATGCTTCTGCTAGTAAGAATTCAGACTCCAATCAAATATGTTTCTTACCTATCCCAAGTGTCTATCTCAAAG
 AGATGATTATTCAGTTTCTCTGGGAGAACTCACACCTTTTCTTATTTTCTTCTTGTGTGCTTCTGAGCTTCATCAAGATGGC
 ACTACCCACTATCATGCTCTTCTCCAGCTTGATAAAAAACCTTGATTAGGGATCCTTCTTTTTCGATTTGAAGGAAATCACCTTAA
 TATCCAGCCAGCTAGAAACTCTAAACAAGTCTTGATTACATATCAAAGGACGGAGATATTAACCAGAGGAGATTCCGAGATC
 ATAAGGTTTCTCCTCGCAAACTGACGCACGATGGAGAATATATCCAGACTGCAACGTCTAAGGAGGAATATCTTGACATGATCA Rep/RepA
 AGGAAGAATTCCCTCATGAATGGGCAACAAAGCTTCAATGGCTGGAATATTCAGCCAACAATATTCCTCCACAACCTGAACCG
 TATGTCGCGCTTACAGAAATCAGATCTTCTGCTGCCACGAAGATCTACATCTGGAGGGAAACCATCTATACCATGTAAGCATA
 GACGCTTATACTATACATACATCTGCTCATACCAACAAGCTCAATCTGACCTTGAATGGATGGCCGATTAAACAAGGACAATGGAA
 GGAATGGAATCCGACACCCAGCCTTACATCTGCGGACCAACTCGTACCGGAAAGACCACCTGGGCTAGAAGTCTCGGACGACA
 CAATATTGGAACGGTACCATCGATTTCAACAACCTACGATGAACACGCCACCTATAATATCATCGACGACATCCCTTCAAGTTTGGTC
 CCATTGTGGAAGCAATTAATAGGTTGCCAGTCTGATTTCACTGTCAACCTAAATATGAAAAAAGAGAAAAATAAAGTGGGAT
 CCTTCTATAATTTCTTGAATCTGACGAGGACTGGATGTTATCAATGACAAAGTCAACAGAAGGATTACTTTAAAGATAATTGCGTC
 ACCCACTACATGTGTGACGGGGAGACTTTTTTGTCTGGGAATCTGCGAGTCACTGA SIR
 GCAACGTGCTCTCTCATACGATTTA
 TCTAAAGTATATTTTTTGGGGTGTGTTTTGGATGTCTTTTTGTATTCTGTGTGTATGTAACATATGTAATTTCTATCT
 ACTTGCAATGAAATATATTCATAAAATAATCATTAT

Red sequence: LIR, Purple sequences: Rep/RepA. In our replicon the extra N terminal is interrupted by TCCCAA sequence, Orange sequence: SIR

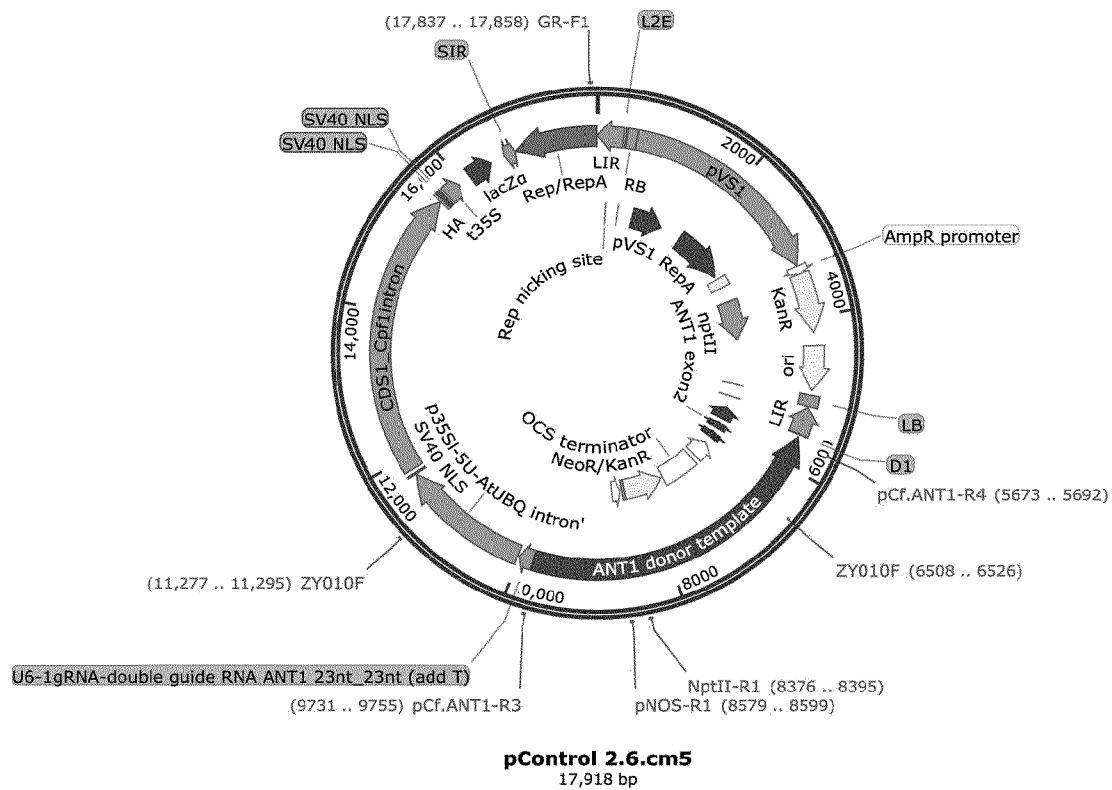
[도3]



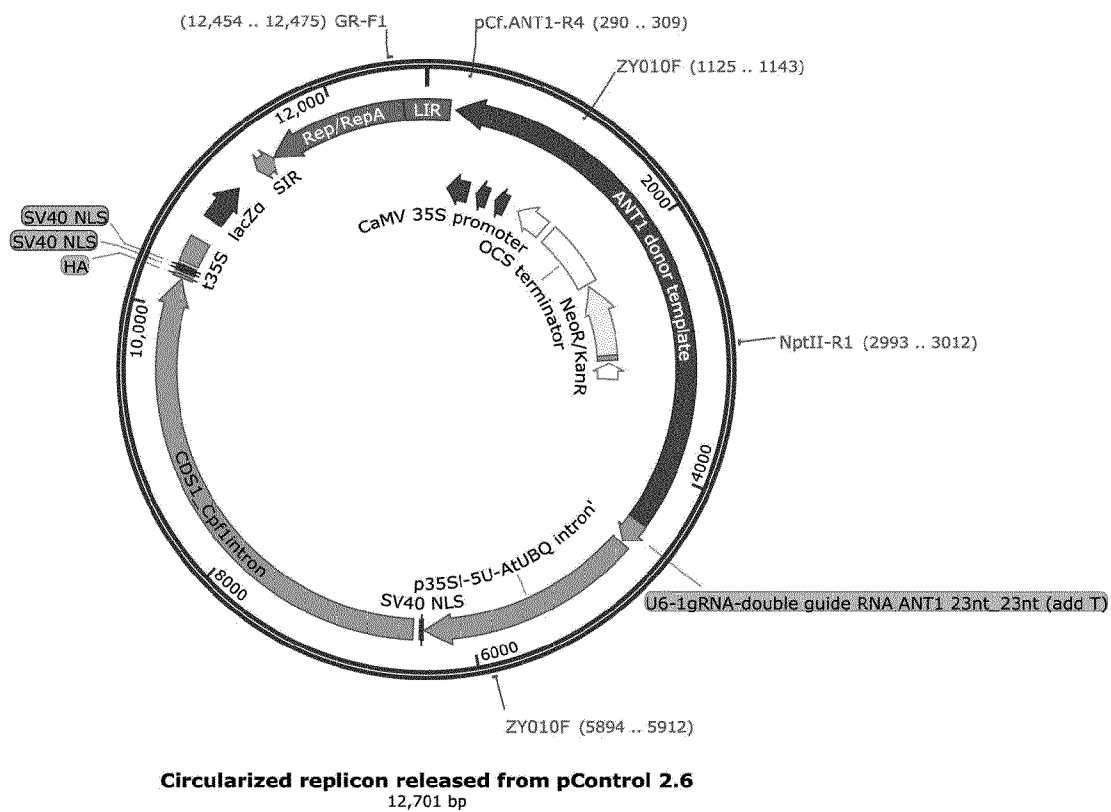
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/011677

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/82(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/82; C07K 14/415; C12N 15/10; C12N 15/83; C12N 5/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: T1 plasmid, geminivirus, BeYDV, MSV, replicon, LB, RB, LIR, SIR, MCS, plant genome, gene editing, insertion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CERMAK, T. et al. High-frequency, precise modification of the tomato genome. <i>Genome Biology</i> . 2015, vol. 16, document 232, pages 1-14 See pages 1, 2, 8; and figures 1, 2.	1-7
A	BALTES, N. J. et al. DNA replicons for plant genome engineering. <i>The Plant Cell</i> . January 2014, vol. 26, pages 151-163 See the entire document.	1-7
A	WO 2016-084084 A1 (DANZIGER INNOVATIONS LTD.) 02 June 2016 See the entire document.	1-7
A	WO 2018-047183 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.) 15 March 2018 See the entire document.	1-7
A	US 2014-0273235 A1 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 18 September 2014 See the entire document.	1-7
A	ZAIDI, S. S. et al. Viral vectors for plant genome engineering. <i>Frontiers in Plant Science</i> . April 2017, vol. 8, document 539, pages 1-6 See the entire document.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 DECEMBER 2019 (20.12.2019)	Date of mailing of the international search report 20 DECEMBER 2019 (20.12.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/011677

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-2002443 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 23 July 2019 See abstract; paragraph [0018]; and claim 1.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/011677

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2016-084084 A1	02/06/2016	CA 2968808 A1	02/06/2016
		EP 3224363 A1	04/10/2017
		IL 252556 A	31/07/2017
		JP 2017-535296 A	30/11/2017
		KR 10-2017-0081268 A	11/07/2017
		US 2017-0260536 A1	14/09/2017
WO 2018-047183 A1	15/03/2018	CA 3036328 A1	15/03/2018
		EP 3510160 A1	17/07/2019
		US 2019-0048330 A1	14/02/2019
US 2014-0273235 A1	18/09/2014	AU 2014-227831 A1	24/09/2015
		BR 112015022522 A2	24/10/2017
		CA 2906747 A1	18/09/2014
		CN 105209624 A	30/12/2015
		EP 2970997 A1	20/01/2016
		HK 1214306 A1	22/07/2016
		JP 2016-512048 A	25/04/2016
		MX 2015011985 A	07/04/2016
		US 2015-0167000 A1	18/06/2015
		WO 2014-144155 A1	18/09/2014
KR 10-2002443 B1	23/07/2019	WO 2019-143077 A1	25/07/2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/82(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/82; C07K 14/415; C12N 15/10; C12N 15/83; C12N 5/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Ti 플라스미드(Ti plasmid), 게미니바이러스(geminivirus), BeYDV, MSV, 레플리콘(replicon), LB, RB, LIR, SIR, MCS, 식물 유전체(plant genome), 유전체 교정(gene editing), 삽입(insertion)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CERMAK, T. 등, `High-frequency, precise modification of the tomato genome`, Genome Biology, 2015, 16권, 문헌 232, 페이지 1-14 페이지 1, 2, 8; 및 도면 1, 2	1-7
A	BALTES, N. J. 등, `DNA replicons for plant genome engineering`, The Plant Cell, 2014.01., 26권, 페이지 151-163 전체 문헌	1-7
A	WO 2016-084084 A1 (DANZIGER INNOVATIONS LTD.) 2016.06.02 전체 문헌	1-7
A	WO 2018-047183 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 2018.03.15 전체 문헌	1-7
A	US 2014-0273235 A1 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 2014.09.18 전체 문헌	1-7
A	ZAIDI, S. S. 등, `Viral vectors for plant genome engineering`, Frontiers in Plant Science, 2017.04., 8권, 문헌 539, 페이지 1-6 전체 문헌	1-7

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 12월 20일 (20.12.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 12월 20일 (20.12.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

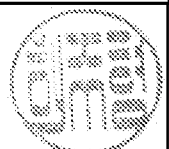
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-2002443 B1 (경상대학교산학협력단) 2019.07.23 요약; 단락 [0018]; 및 청구항 1	1-7

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2016-084084 A1	2016/06/02	CA 2968808 A1 EP 3224363 A1 IL 252556 A JP 2017-535296 A KR 10-2017-0081268 A US 2017-0260536 A1	2016/06/02 2017/10/04 2017/07/31 2017/11/30 2017/07/11 2017/09/14
WO 2018-047183 A1	2018/03/15	CA 3036328 A1 EP 3510160 A1 US 2019-0048330 A1	2018/03/15 2019/07/17 2019/02/14
US 2014-0273235 A1	2014/09/18	AU 2014-227831 A1 BR 112015022522 A2 CA 2906747 A1 CN 105209624 A EP 2970997 A1 HK 1214306 A1 JP 2016-512048 A MX 2015011985 A US 2015-0167000 A1 WO 2014-144155 A1	2015/09/24 2017/10/24 2014/09/18 2015/12/30 2016/01/20 2016/07/22 2016/04/25 2016/04/07 2015/06/18 2014/09/18
KR 10-2002443 B1	2019/07/23	WO 2019-143077 A1	2019/07/25