

作物改良领域人工核酸酶技术全球专利布局分析

何湘琼¹, 赵永江¹, 谭永华², 田野¹, 田文文¹, 朱宁¹, 潘卫东^{2*}

(1. 国家知识产权局专利局专利审查协作湖北中心, 湖北武汉 430070; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州贵阳 550002)

摘要 利用德温特世界专利索引数据库(DWPI), 分析作物改良领域人工核酸酶技术专利布局, 揭示关键技术发展方向和趋势、技术分布区域、专利申请人情况、竞争对手情况以及各技术方向对应的技术功效分布, 以期为我国研究者的技术研发和专利布局提供参考。

关键词 人工核酸酶; 基因编辑技术; 作物改良; 专利; 布局

中图分类号 N18 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)23-072-04

Layout and Analysis of Worldwide Patents on the Designer Nuclease Technology of Crops Improvement

HE Xiang-qiong¹, ZHAO Yong-jiang¹, TAN Yong-hua², PAN Wei-dong^{2*} et al (1. Patent Examination Cooperation Hubei Center of the Patent Office, SIPO, Wuhan, Hubei 430070; 2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550002)

Abstract Based on the Derwent World Patents Index database (DWPI), the layout of worldwide patents on the designer nuclease technology of crops improvement was analyzed. The development trend of key technology, technique distribution area, situation about patent applicants and competitors, distribution of technical efficacy were revealed, so as to provide reference for technology research and development and patent layout of researchers in China.

Key words Designer nuclease; Genome editing technique; Crop improvement; Patent; Layout

对高等生物基因组进行高效、精确的定点改造是科学家多年来的研究目标, 在该过程中发展出了多种提高基因组定点编辑效率的策略^[1-2]。然而, 只有在锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)代表的人工核酸酶介导的基因组编辑技术出现后, 基因编辑技术在转基因作物领域才有了实质性发展^[3]。2015年8月, 达沃斯世界经济论坛发布了2015年度十大新兴技术, 其中包含了基因编辑技术, 认为其是能够改善农作物质量、减少各方争议的突破性技术。人工核酸酶介导的基因组编辑技术是当前发展的热点, 包括: ZFN、大范围核酸酶(Meganuclease, MGN)、转录激活因子样效应因子核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)和基于成簇的规律间隔的短回重复序列的基因组编辑技术(Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR)^[4]。

在产业方面, TALEN技术的应用已经推进了基因编辑技术在作物改良领域的快速应用(鉴于使用基因编辑技术产生的作物是否为转基因作物业界尚有争议, 该文将该应用领域统称“作物改良”)^[5-6]。美国公司Calyxt(原Collectis Plant Science)利用TALEN技术研发了耐冷藏土豆和改善油品质的大豆, 2015年11月, Calyxt宣布完成了改善油品质大豆的第2次田间试验, 以及耐冷藏土豆的第1次田间试验。在TALEN技术发展的短短5年时间内取得如此成就, 展现了基因编辑技术在作物改良方面的高效率。

基于对德温特世界专利索引数据库(Derwent world patents index database, DWPI)人工核酸酶技术在转基因作物领域的应用专利样本进行的检索(检索截止日期为2015年8

月24日, 样本数量为429项专利申请文献), 该文分析了全球范围内人工核酸酶技术在作物改良领域的专利申请情况, 揭示全球范围内技术发展的趋势、技术分布的区域、各技术方向发展的趋势、主要申请人的专利布局情况, 以及各技术方向对应的技术功效分布, 以期为我国研究者的技术研发和专利布局提供参考。

1 时间趋势

人工核酸酶介导的基因编辑作为一种安全、高效的基因编辑工具受到了国际农业组织、国际大型农业科技公司的重视, 各大组织和公司在基因组学研究、作物遗传改良等项目计划中皆布局了不同技术方向的研究。

由图1可知, 在作物改良领域, 人工核酸酶技术的应用呈现振荡上升的趋势, 近年来在新技术的推动下发展尤为迅速。自20世纪末锌指蛋白(Zinc finger protein, ZFP)和ZFN技术发展以来, 该技术即在农业领域产生了一定的影响, 形成了1999年的峰值, 该阶段的主要研究方向集中在新的ZFP蛋白发现、ZFP设计与筛选以及利用ZFP进行转录调控方面, 但ZFN的设计与实现也在该时间段作出; 自2004年Dana Carroll展示了ZFN技术在生物体应用后, 其又在生物体内基因的原位编辑(NHEJ途径)以及基因精确突变等方面掀起了新的增长, 会同大范围核酸酶在这一时期的发展促成了2004年后的增长趋势; 2010年之后, TALEN技术和CRISPR技术迅速崛起, 在农业领域得到了较大关注, 因此该领域申请量近年来迅速增长。

2 区域趋势

2.1 技术研发国分布 在技术区域分布上, 美国、中国和欧洲分列前3位。其中, ZFN、大范围核酸酶以及TALEN技术的基础突破分别由英国、法国和德国科学家完成, 而CRISPR技术的基础突破由欧洲科学家和美国科学家共同完成, 可以看出欧洲在生物学的基础研究上有着深厚的积淀。而上述四个技术方向应用方面的突破, 除了大范围核酸酶技术外,

基金项目 贵州省高层次人才培养计划项目(黔科合人才[2016]4037)。

作者简介 何湘琼(1976-), 男, 湖北鄂州人, 副研究员, 硕士, 从事发明专利审查研究。*通讯作者, 研究员, 博士, 从事天然农药研究。

收稿日期 2016-06-17

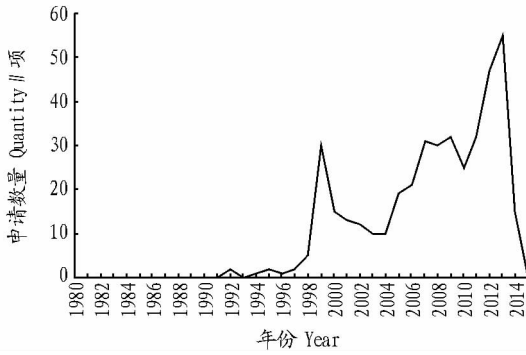


图1 人工核酸酶技术全球时间趋势

Fig.1 The global temporal trend of designer nuclease technology

皆由美国科学家实现并由美国公司主导市场,反映出美国在技术产业化方面所具有的优势。

2.2 目标市场国分布 由图3可知,在人工核酸酶技术的目标市场国中,通过专利合作协定(Patent cooperation treaty, PCT)途径和欧洲专利局(European patent office, EPO)途径提出的分别排名第1和第3,表明这些申请进入多个国家,寻求



图3 人工核酸酶技术全球目标市场国分布

Fig.3 The global target market countries distribution of designer nuclease technology

3 技术分布及专利申请人情况分析

3.1 技术方向分析 由图4可知,从各技术分支来看,大范围核酸酶技术(MGN)发展最早,在1992年(最早优先权日)法国巴斯德研究所的申请即公开了大范围核酸酶诱导双链DNA断裂的方法,可在供体DNA存在下通过同源重组途径修复,并且指出了该技术在转基因作物领域的应用前景,但该技术长期以来一直未得到足够重视,直至Collectis公司成立,进一步在基因治疗等领域深入发展该技术,使该技术在2007年达到高峰,但是大范围核酸酶与其他人工核酸酶不同,其识别域和切割域并非分离的功能单元,存在设计和筛选困难的问题,因此在ZFN技术的压制及TALEN技术和CRISPR技术的迅速发展下,近年来呈现下滑的趋势。事实上,许多文献未将该技术列入人工核酸酶领域,但其在人工核酸酶研究和产业方面有着重要的意义。

ZFN技术于1995年前后开始发展,此后由于3个方面的原因迅速发展:①大量锌指蛋白结构的转录调控因子被发

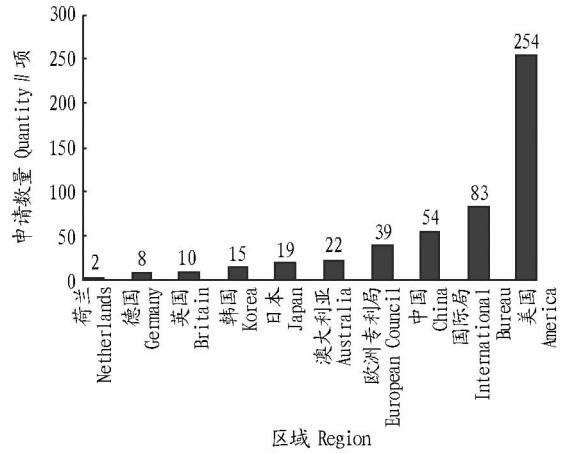


图2 全球人工核酸酶技术的区域分布

Fig.2 The global distribution of designer nuclease technology

区域全面性保护的需求,由于该技术领域的技术原创国主要是美国,因此体现了美国在人工核酸酶领域的“圈地运动”;而美国、欧洲、澳大利亚、中国和加拿大皆是转基因产业较为关注的传统市场。

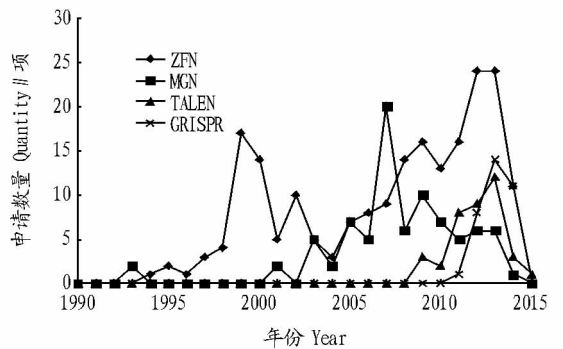


图4 人工核酸酶技术分支发展时间趋势

Fig.4 The time trend of the branch development of designer nuclease technology

现;②MRC与SCRIPPS研究院等机构对锌指蛋白设计与筛选方法的广泛研究;③ZFN-FokI嵌合酶结构的提出。此后,由于Sangamo公司对该技术的垄断,导致申请量有了一

定下滑,但在 Dana Carroll 实现了该技术在生物体的应用后,ZFN 技术才有了进一步的发展;由于 Sangamo 公司的垄断、设计/筛选的难度以及新技术的兴起,近年来也呈现了下降的趋势,但在总量上依然处于优势地位。

大范围核酸酶技术由法国公司 Collectis 推向市场,该公司 1999 年的成立得益于法国政府的支持。1999 年,巴黎议会通过了新的“创新法案”,通过放松司法限制以及提供财务和税务激励等,鼓励法国科学家创建起步公司。该法案涉及预算 9.95 亿法郎(1.62 亿美元),其中 3.95 亿用于生命科学,包括生物技术^[7]。受产业市场和资本市场的吸引,Collectis 公司在美国先后成立了 Calyxt, Inc. (原 Collectis Plant Science) 和 Collectis, Inc. 两个分支机构,前者专注于农业领域的应用,并对 TALEN 技术有所涉及,而后者主要专注基因治疗。

TALEN 技术发展于德国马丁·路德大学(Martin-Luther University)的细菌学家乌拉·伯纳斯(Ulla Bonas)对 TAL 效应因子(TAL effector, TALE)编码的解析,Dan Voytas 迅速将 TAL 识别域和 FokI 切割域嵌合形成人工核酸酶,并将其引入转基因作物领域。由于其识别域 TALE 在设计筛选方面相比 ZFP 的明显优点,因此自 2010 年后其热度呈指数上升。Dan Voytas 参与创立的 Calyxt 公司已经完成经 TALEN 技术改良的大豆和马铃薯的田间试验。

RNA 介导的、基于成簇的规律间隔的短回文重复序列和 Cas 蛋白的 DNA 核酸内切酶(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat(CRISPR)/Cas-based RNA-guided DNA endonucleases, CRISPR/Cas)基因组编辑技术正式诞生于 2012 年,之后便迅速成为基因组编辑技术的代名词,Dan Voytas 迅速将其带入转基因作物领域,我国转基因作物领域的研究人员对此也表现出浓厚的兴趣。

3.2 重要申请人分析 由图 5 可知,排名第 1 和第 2 的公司分别是致力于发展基因编辑技术的 Collectis 和 Sangamo,前者主要专注大范围核酸酶技术开发,近年来在 TALEN 技术方向上发展迅速,而 Sangamo 公司则垄断了 ZFN 技术。排名第 1 的 Collectis 公司由 André Choulika 在法国研究部的资助下于 1999 年创立,致力于基于基因编辑的基因治疗技

术。其核心技术包括 TALENTM 产品和大范围核酸酶技术,André Choulika 最早发展了基于大范围核酸酶对复杂基因组进行编辑的技术。Collectis 的子公司 Calyxt, Inc. 成立于 2010 年,位于明尼苏达州。公司发展了用于提高作物质量的技术平台,并与各大公司形成合作网,其中包括农业领域的拜尔、孟山都以及 SESVanderhave 等,制药领域的 Medicago 公司和一些食品公司。排名第 2 的 Sangamo 公司致力于 ZFN 技术,其对 ZFN 技术的专利垄断在产业界和科研界饱受争议。

各大转基因巨头在人工核酸酶技术领域也皆有布局,但是在数量上并不突出,申请量最大的 DOW 公司也未超过 30 件。各公司专注的方向差异较大,DOW 公司从 Sangamo 公司获得 ZFN 独家许可,在此基础上发展了研发平台;而 Monsanto 公司、BASF 公司等从 Collectis 公司和 Precision 公司获得大范围核酸酶技术的许可,在该技术方向上进行了一些布局。由表 1 可知,各大公司的技术方向布局,DOW 公司对 ZFN 技术在转基因作物领域的独占许可表明了 Sangamo 公司对于 ZFN 技术的垄断。

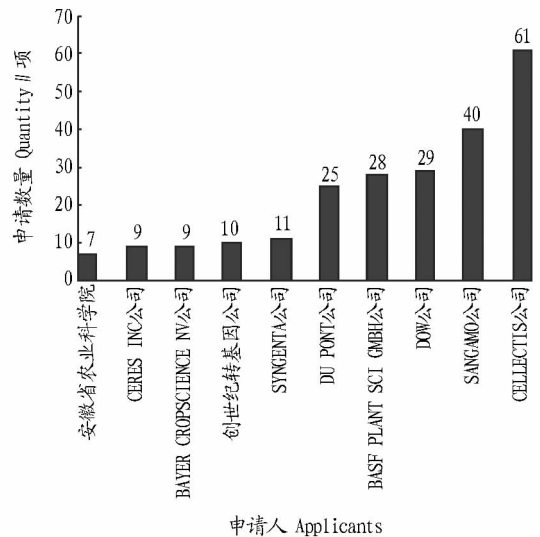


图 5 人工核酸酶技术主要申请人分析

Fig. 5 The analysis of principal applicants of designer nuclease technical

表 1 各公司技术分支分布

Table 1 The distribution of the company's technology branch

技术分类 Technique distribution	DOW	BASF	DUPONT	Monsanto	Bayer	SYNGENTA
ZFP	1	11	8	2	0	7
ZFN	27	0	0	0	0	0
MGN	0	5	5	0	6	2
TALEN	0	0	0	2	2	0
CRISPR	0	0	1	0	0	0

我国申请人创世纪转基因公司和安徽省农业科学院分别排名第 7 和第 10,表明我国产业界和学术界已经开始关注人工核酸酶技术方向,创世纪转基因公司主要关注的方向是锌指蛋白转录因子的发现,尚未真正进入人工核酸酶介导基因组编辑的领域;而安徽省农业科学院在 TALEN 技术与 CRISPR 技术应用于转基因作物开发方面进行了很多有益的

尝试,主要工作是针对植物的内源基因进行靶向剪切,引发内源基因的 NHEJ 修复机制,造成内源基因的剪切从而敲除该基因,并获得性状改变的作物,植物的很多性状受内源基因负向调节,因此该方法对开发新性状的植物具有重要的意义。

3.3 技术功效分析 人工核酸酶可造成基因组在特异的位

点产生 DNA 双链断裂,从而激活非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)等 DNA 修复机制。借此可对基因组 DNA 进行遗传定点修饰,主要的方式有:NHEJ 途径介导的精确突变、同

源重组介导的突变或插、区段删除、连锁叠加、转录调控^[8]。人工核酸酶的另外一个应用是利用序列特异性,通过靶向转录因子的结合位点或产生合成转录因子的方法,调控内源基因的转录。

表 2 各技术方向对基因的操作方式

Table 2 The operation modes of genes by each technical direction

项

技术分类 Technique distribution	NHEJ	HR 突变或插入 HR mutation or insertion	区段删除 Block deletion	连锁叠加 Cascading stack	转录调控 Transcriptional regulation
ZFN	26	17	3	1	150
MGN	24	16	2	3	0
TALEN	18	3	0	0	8
CRISPR	24	3	0	0	1

从表 2 可知,最早发展的 ZFN 技术和 MGN 技术已经在基因操作的多个方面得到了应用,但 NHEJ 途径仍然占据主导地位,而 TALEN 技术和 CRISPR 技术则主要集中在 NHEJ 途径。事实上,目前 4 种人工核酸酶皆被大量用于通过 NHEJ 途径对作物进行突变,该途径虽然只能实现基因的敲除,但是对作物开发具有重要的意义。

对于较为复杂的精确基因编辑操作,例如 HR 突变、插入以及连锁叠加方面,专利数量较少,表明在植物体内实现同源重组依然较为困难;区段删除由于需要在植物体内同时表达至少两组人工核酸酶,因此技术难度较大,目前能够实现的作物和目标基因也较少。

锌指蛋白和 TALE 被大量用于转录调节,与其分子结构的天然性质有关;对于 ZFP 而言,所涉及的大量申请为锌指转录因子蛋白的发现及其序列解析,例如我国申请人创世纪种业的申请皆是该类型。

4 结语

4.1 人工核酸酶技术在作物改良领域发展迅速 该技术领域近年来发展迅速,许可活动密集,其中使用 TALEN 技术开发的作物已经完成田间试验,并且其有望在全球范围内取得宽松的监管,因此基因编辑是作物品种改良领域高效、安全技术的最新方向。

4.2 人工核酸酶技术的发展方向 TALEN 技术与 CRISPR 技术是人工核酸酶技术的发展趋势,在作物领域的应用也处于迅速发展期,我国转基因作物领域的研发人员已经在 TALEN 与 CRISPR 技术应用方面取得一定突破,然而在专利布局层面却没有取得转基因作物领域基础应用的专利。

4.3 作物改良领域的布局方向 TALEN 与 CRISPR 在转基因

因作物的应用目前集中于 NHEJ 途径的基因敲除操作,在基因靶向突变或替换、基因插入以及基因删除等方面仍然有大量可以布局的方向;此外,由于植物为多倍体,基因操作较为困难,因此提高操作效率的基因操作方法(包括获取转基因植株的方法)以及载体等工具方面也可以进行研发和布局。

4.4 人工核酸酶的研发方向 人工核酸酶四个技术方向皆是基于对生物化学特定机制进行揭示和解析后获得工具和方法,结构生物学在其中起着重要的作用,我国结构生物学的研究已经进入世界前沿,并且参与了人工核酸酶的发展,我国科学家应在深入基础研究的同时,兼顾应用研究,发展最新的工具和方法;此外,应大力发展国际合作和人才引进,使得基础研究和应用研究能够把握最新的技术方向。

参考文献

- [1] MARIA L, CLAUDIA P, DAMIEN P, et al. Development of new biotechnologies in plant breeding[J]. Nature biotechnology, 2012, 30(3): 231-239.
- [2] 谢科, 饶力群, 李红伟, 等. 基因组编辑技术在植物中的研究进展与应用前景[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(6): 99-104.
- [3] VIPULA K S, YANNICK D, JEFFREY C M, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases[J]. Nature, 2009, 459(21): 437-441.
- [4] LI T, LIU B, SPALDING M H, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice[J]. Nature biotechnology, 2012, 30(5): 390-392.
- [5] SHAN Q W, ZHANG Y, CHEN K L, et al. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsbADH2* gene using TALEN technology[J]. Plant biotechnology journal, 2015, 13(6): 791-800.
- [6] SHAN Q, WANG Y, LI Y, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. Nature biotechnology, 2013, 31(8): 686-688.
- [7] LOUET S. New law to boost French biotech industry[J]. Nature biotechnology, 1999, 17(11): 1055.
- [8] NICOLAS J B, DANIEL F V. Enabling plant synthetic biology through genome engineering[J]. Trends in biotechnology, 2014, 33(2): 120-131.

名词解释

1 **总被引频次** 指该期刊自创刊以来所登载的全部论文在统计当年的统计刊源中被引用的总次数。该指标反映了该期刊在学术交流中总体被使用和受重视的程度,是文献计量中的一个基础性指标。

2 **影响因子** 指某期刊前两年发表的论文在统计当年的被引用总次数与该期刊在前两年内发表的论文总数之比。这是一个国际上通行的传统评价指标,又可称作 2 年影响因子(IF2)。计算公式为:

$$\text{影响因子 (IF2)} = \frac{\text{该期刊前两年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该期刊前两年发表论文总数}}$$