

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2015122802, 26.11.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
28.11.2012 US 61/730,771

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2017 Бюл. № 01

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 29.06.2015(86) Заявка РСТ:  
US 2013/072088 (26.11.2013)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/085501 (05.06.2014)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,  
"Гоулингз Интернэшнл Инк.", Карпенко Оксана  
Юрьевна

(71) Заявитель(и):

**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛС  
ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**ГОНГ Гуочан (US),  
ЛАИ Ка-Ман Винус (US),  
ВАЛЕНЗУЭЛА Дэвид М. (US)**(54) **КЛОНИРОВАННОЕ ЖИВОТНОЕ, ОТЛИЧНОЕ ОТ ЧЕЛОВЕКА, КОТОРОЕ НЕ СОДЕРЖИТ  
СЕЛЕКТИВНЫЙ МАРКЕР**

## (57) Формула изобретения

1. Генетически модифицированная соматическая клетка животного, отличного от человека, которая содержит самоудаляющуюся кассету для экспрессии рекомбиназы, содержащую ген сайт-специфической рекомбиназы, функционально связанный с промотором, специфичным для эмбриональных стволовых (ЭС) клеток,

причем указанная кассета с сайт-специфической рекомбиназой в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации, ориентированными в одном и том же направлении по отношению друг к другу так, что указанная кассета может быть удалена в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы, и

при этом указанный промотор, специфичный для ЭС-клеток, обеспечивает транскрипцию гена сайт-специфической рекомбиназы в недифференцированных плюрипотентных стволовых клетках, но не в генетически модифицированных соматических клетках.

2. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная соматическая клетка выбрана из группы, состоящей из клетки кожи, клетки крови, нервной клетки, мышечной клетки, клетки кости, клетки почки, клетки печени и жировой клетки.

3. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем,

что указанная соматическая клетка представляет собой фибробласт.

4. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 3, отличающаяся тем, что указанный фибробласт получен из свиньи.

5. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 4, отличающаяся тем, что указанная свинья является карликовой свиньей.

6. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 3, отличающаяся тем, что указанный фибробласт получен из коровы.

7. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанный промотор, специфичный для ЭС-клеток, выбран из группы, состоящей из промотора Oct-3/4, промотора Sox2, промотора Kif4, промотора с-Мус, промотора Nanog, промотора Lin28 и их комбинации.

8. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанный промотор, специфичный для ЭС-клеток, обеспечивает транскрипцию гена указанной сайт-специфической рекомбиназы в ЭС-клетках эмбриона на стадии бластоцисты.

9. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная самоудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы дополнительно содержит ген селективного маркера между указанными первым и вторым сайтами рекомбинации, причем указанный ген селективного маркера функционально связан с промотором.

10. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 9, отличающаяся тем, что указанный промотор, функционально связанный с указанным геном селективного маркера, представляет собой конститутивный промотор.

11. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная самоудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы не содержит гена селективного маркера, и указанный ген селективного маркера расположен в другом локусе генома указанной соматической клетки, и при этом указанный ген селективного маркера в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирован третьим и четвертым сайтами рекомбинации, ориентированными в одном и том же направлении по отношению друг к другу таким образом, что указанный селективный маркер может быть удален в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы.

12. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что генетически модифицированный геном указанной соматической клетки содержит аллель, инактивирующийся в заданных условиях, и при этом указанный аллель, инактивирующийся в заданных условиях, в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирован первым и вторым сайтами рекомбинации так, что указанный аллель, инактивирующийся в заданных условиях, может быть удален в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы.

13. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная кассета для экспрессии рекомбиназы содержит нуклеотидную последовательность, гомологичную по меньшей мере одному экзону эндогенного гена-мишени, причем указанная нуклеотидная последовательность в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации.

14. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная кассета для экспрессии рекомбиназы содержит нуклеотидную последовательность, гомологичную по меньшей мере одному интрону эндогенного гена-мишени, причем указанная нуклеотидная последовательность в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации.

15. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная самоудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы располагается

в транскрипционно активном локусе генома указанной соматической клетки.

16. Генетически модифицированная соматическая клетка по п. 1, отличающаяся тем, что указанная сайт-специфическая рекомбиназа выбрана из группы, состоящей из рекомбиназ Cre, Flp и Dre.

17. Способ получения генетически модифицированного и клонированного животного, отличного от человека, не содержащего гена селективного маркера и гена рекомбиназы, включающий:

(а) осуществление внедрения конструкции нуклеиновой кислоты в дифференцированную соматическую клетку животного, отличного от человека, с получением генетически модифицированного генома;

(b) осуществление переноса указанного генетически модифицированного генома, полученного на этапе (а), в ооцит хозяина с удаленным ядром;

(с) осуществление слияния и активации указанного ооцита, полученного на этапе (b), с получением искусственной зиготы;

(d) культивирование указанной искусственной зиготы, полученной на этапе (с), до момента достижения указанной зиготой стадии бластоцисты; и

(е) осуществление имплантации указанной бластоцисты, полученной на этапе (d), в матку суррогатной матери, с получением генетически модифицированного клонированного животного, отличного от человека, не содержащего гена указанного селективного маркера и указанного гена рекомбиназы,

причем указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит самоудаляющуюся кассету для экспрессии рекомбиназы, содержащую ген сайт-специфической рекомбиназы, функционально связанный с промотором, специфичным для ЭС клеток,

при этом указанная кассета для экспрессии рекомбиназы, в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации, ориентированными в одном и том же направлении так, что кассета может быть удалена в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы, и

причем указанный промотор, специфичный для ЭС-клеток, обеспечивает транскрипцию гена указанной сайт-специфической рекомбиназы в недифференцированных плюрипотентных стволовых клетках, но не в дифференцированной соматической клетке.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанный промотор, специфичный для ЭС-клеток, выбран из группы, состоящей из промотора Oct-3/4, промотора Sox2, промотора Kif4, промотора с-Мус, промотора Nanog, промотора Lin28 и их комбинации.

19. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанная самоудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы содержит ген селективного маркера, расположенный между первым и вторым сайтами рекомбинации, причем указанный ген селективного маркера функционально связан с промотором.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанный промотор, функционально связанный с указанным геном селективного маркера, является конститутивным промотором.

21. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанная самоудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы не содержит ген селективного маркера, и указанный ген селективного маркера расположен в другом локусе генома указанной соматической клетки, причем указанный ген селективного маркера в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирован третьим и четвертым сайтами рекомбинации, ориентированными в одном и том же направлении по отношению друг к другу таким образом, что указанный селективный маркер может быть удален в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы.

22. Способ по п. 17, отличающийся тем, что геном указанной соматической клетки

содержит аллель, инактивирующийся в заданных условиях, причем указанный аллель, инактивирующийся в заданных условиях, в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирован первым и вторым сайтами рекомбинации так, что указанный аллель, инактивирующийся в заданных условиях, может быть удален в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы.

23. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, гомологичную по меньшей мере одному экзону эндогенного гена-мишени, причем указанная нуклеотидная последовательность в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации.

24. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, гомологичную по меньшей мере одному интрону эндогенного гена-мишени, причем указанная нуклеотидная последовательность в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации.

25. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит ген селективного маркера, функционально связанный с промотором.

26. Способ по п. 23, отличающийся тем, что указанный промотор представляет собой конститутивный промотор.

27. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанная сайт-специфическая рекомбиназа выбрана из группы, состоящей из рекомбиназ Cre, Flp и Dre.

28. Клонированный ооцит животного, отличного от человека, содержащий генетически модифицированный геном дифференцированной соматической клетки, причем указанный генетически модифицированный геном содержит самоудаляющуюся кассету, для экспрессии рекомбиназы, в которой ген сайт-специфической рекомбиназы функционально связан с промотором, специфичным для ЭС-клеток, причем указанная самоудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы, фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации, ориентированными в одном и том же направлении по отношению друг к другу так, что указанная кассета может быть удалена в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы.

29. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанное животное, отличное от человека, выбрано из группы, состоящей из мыши, крысы, кролика, птицы, коровы, свиньи, овцы, козы, лошади и осла.

30. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанная дифференцированная соматическая клетка выбрана из группы, состоящей из клетки кожи, клетки крови, нервной клетки, мышечной клетки, клетки кости, клетки печени и жировой клетки.

31. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанная дифференцированная соматическая клетка представляет собой фибробласт.

32. Клонированный ооцит по п. 31, отличающийся тем, что указанный фибробласт получен из свиньи.

33. Клонированный ооцит по п. 32, отличающийся тем, что указанная свинья является карликовой свиньей.

34. Клонированный ооцит по п. 31, отличающийся тем, что указанный фибробласт получен из коровы.

35. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанный промотор, специфичный для ЭС-клеток, выбран из группы, состоящей из промотора Oct-3/4, промотора Sox2, промотора Klf4, промотора c-Myc, промотора Nanog, промотора Lin28 и их комбинации.

36. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанный промотор,

специфичный для ЭС-клеток, обеспечивает транскрипцию указанного гена сайт-специфической рекомбиназы в ЭС-клетках эмбриона на стадии бластоцисты.

37. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанная самоуудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы дополнительно содержит ген селективного маркера между первым и вторым сайтами рекомбинации, причем указанный ген селективного маркера функционально связан с промотором.

38. Клонированный ооцит по п. 37, отличающийся тем, что указанный промотор, функционально связанный с геном указанного селективного маркера, является конститутивным промотором.

39. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанная самоуудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы не содержит гена селективного маркера, и указанный ген селективного маркера расположен в другом локусе генома указанной соматической клетки, причем указанный ген селективного маркера в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирован третьим и четвертым сайтами рекомбинации, ориентированными в одном и том же направлении по отношению друг к другу таким образом, что указанный селективный маркер может быть удален в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы.

40. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанный геном соматической клетки содержит аллель, инактивирующийся в заданных условиях, причем указанный аллель, инактивирующийся в заданных условиях, в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирован первым и вторым сайтами рекомбинации так, что указанный аллель, инактивирующийся в заданных условиях, может быть удален в присутствии указанной сайт-специфической рекомбиназы.

41. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанная самоуудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы, содержит нуклеотидную последовательность, гомологичную по меньшей мере одному экзону эндогенного гена-мишени, причем указанная нуклеотидная последовательность в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации.

42. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанная самоуудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы содержит нуклеотидную последовательность, гомологичную по меньшей мере одному интрону эндогенного гена-мишени, причем указанная нуклеотидная последовательность в 3'-5' направлении и в 5'-3' направлении фланкирована первым и вторым сайтами рекомбинации.

43. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанная самоуудаляющаяся кассета для экспрессии рекомбиназы расположена в транскрипционно активном локусе генома указанной соматической клетки.

44. Клонированный ооцит по п. 28, отличающийся тем, что указанная сайт-специфическая рекомбиназа выбрана из группы, состоящей из рекомбиназ Cre, Flp и Dre.