



(51) МПК  
*C12N 5/07* (2010.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 5/00* (2006.01)  
*C12N 5/02* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*C12N 15/8509* (2022.02); *C12N 15/8775* (2022.02); *A01K 67/02* (2022.02); *A01K 67/0271* (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2019114118, 20.02.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
20.02.2014

Дата регистрации:  
15.06.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
20.02.2013 US 61/767,093

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2015139350 20.02.2013

(43) Дата публикации заявки: 31.05.2019 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 15.06.2022 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11,  
Джермакян Рубен Валерьевич

(72) Автор(ы):

ЛИИ, Джефрей Д. (US),  
 ОЕРБАХ, Вожтек (US),  
 ХЕЛСИН, Дэвид (US),  
 ФРЕНДВЕЙ, Дэвид (US),  
 ЛАИ, Ка-ман Венус (US),  
 ВАЛЕНЦУЭЛА, Дэвид М. (US)

(73) Патентообладатель(и):

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЮТИКАЛС, ИНК.  
(US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US20120272349 A1, 25.10.2012. PING  
L, et al. Germline Competent Embryonic Stem  
Cells Derived from Rat Blastocyst, Cell, 200, Vol.  
135, N.7, pp.1299-1310. WO1997030151 A1,  
21.08.1997. ВЕРХОВСКАЯ Л.З. и др. Действие  
алкоксизамещенных глицерина на  
морфофункциональные свойства перевиваемой  
культуры клеток, Криобиология. 1990; 1:30-33.

(54) ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КРЫС

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к композиции для культивирования и поддержания плюрипотентности крысиной эмбриональной стволовой (ЭС) клетки, содержащей фидерный клеточный слой, не модифицированный для экспрессии фактора ингибирования лейкемии

(LIF), среду, которая поддерживает плюрипотентность крысиных ЭС клеток и популяцию из одной или более крысиных ЭС клеток. Изобретение эффективно для получения целевой генетической модификации в крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клетках. 2 н. и 45 з.п. ф-лы, 11 ил., 15 табл., 3 пр.

С 2  
9 2 0 7 6  
2 7 7 4 0 7 6  
R U

R U  
2 7 7 4 0 7 6  
C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 5/07* (2010.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 5/00* (2006.01)  
*C12N 5/02* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12N 15/8509* (2022.02); *C12N 15/8775* (2022.02); *A01K 67/02* (2022.02); *A01K 67/0271* (2022.02)

(21)(22) Application: **2019114118, 20.02.2014**(24) Effective date for property rights:  
**20.02.2014**Registration date:  
**15.06.2022**

Priority:

(30) Convention priority:  
**20.02.2013 US 61/767,093**Number and date of priority of the initial application,  
from which the given application is allocated:  
**2015139350 20.02.2013**(43) Application published: **31.05.2019 Bull. № 16**(45) Date of publication: **15.06.2022 Bull. № 17**

Mail address:

**119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, 11,  
Dzhermakyan Ruben Valerevich**

(72) Inventor(s):

**LEE, Jeffrey, D. (US),  
AUERBACH, Wojtek (US),  
HELSIN, David (US),  
FRIENDWEY, David (US),  
LAI, Ka-man Venus (US),  
VALENZUELA, David M. (US)**

(73) Proprietor(s):

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.  
(US)****(54) RAT GENETIC MODIFICATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, in particular to a composition for the cultivation and maintenance of pluripotency of a rat embryonic stem (hereinafter – ES) cell containing a feeder cell layer non-modified for the expression of a

leukemia inhibition factor (LIF), a medium that maintains pluripotency of rat ES cells, and a population of one or more rat ES cells.

EFFECT: invention is effective for obtaining a target genetic modification in rat embryonic stem (ES) cells.  
47 cl, 11 dwg, 15 tbl, 3 exC 2  
9 2 0 7 6  
2 7 7 4 0 7 6  
R UR U  
2 7 7 4 0 7 6  
C 2

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Плюрипотентные, тотипотентные и эмбриональные стволовые (ЭС) клетки, не относящиеся к человеку, в частности крысиные плюрипотентные, тотипотентные и/или крысиные ЭС клетки и способы их получения. Предлагаются способы получения плюрипотентных, тотипотентных и ЭС клеток крыс. Предлагаются способы нацеливания плюрипотентных, тотипотентных и ЭС клеток крыс. Предлагаются способы достижения трансмиссии через зародышевую линию генетической модификации в клетку крысы. Предлагаются среды для получения, выращивания и поддержания плюрипотентных, тотипотентных и ЭС клеток крыс.

## ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ВИДЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА ЧЕРЕЗ EFS-WEB

Официальная копия перечня последовательностей представлена одновременно со спецификацией в виде текстового файла через EFS-Web в соответствии с Американским стандартным кодом для обмена информацией (ASCII), с названием файла 441914seqlist.txt, датой создания 20 февраля 2014 г. и размером 2 килобайта. Перечень последовательностей, поданный с помощью EFS-Web, является частью спецификации и включен в данное описание в полном объеме посредством ссылки.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Крыса является важной моделью для многих видов применения, включая, но не ограничиваясь этим, применение в разработке лекарственных средств. Практическая значимость крыс была несколько уменьшена из-за сложностей в получении генетически модифицированных крыс, в частности, в разработке способов генетической модификации крыс и создании пригодных для применения крысиных клеток, которые могут быть использованы в протоколах генетических модификаций, включая, но не ограничиваясь этим, протоколы, которые приводят к трансмиссии через зародышевую линию генетической модификации в геном крыс.

В данной области техники существует необходимость в крысиных клетках (например, эмбриональных стволовых клетках), которые могут быть генетически модифицированы таким образом, что генетическую модификацию можно передавать через зародышевую линию. В данной области техники существует необходимость в улучшении частоты трансмиссии через зародышевую линию генетических модификаций у крыс.

В данной области техники существует необходимость в донорских крысиных плюрипотентных, тотипотентных и ЭС клетках от разных линий крыс, способных производить потомство F0, или полностью полученных из донорских клеток крыс F0. В данной области техники существует необходимость в донорских крысиных плюрипотентных, тотипотентных и ЭС клетках, способных производить крыс, имеющих генетическую модификацию зародышевой линии.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предлагаются композиции и способы получения крысиных плюрипотентных и/или тотипотентных клеток, в том числе крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток. Предлагаются композиции и способы повышения эффективности или частоты трансмиссии через зародышевую линию генетических модификаций у крыс. В различных аспектах способы и композиции включают *in vitro* культуру, которая содержит фидерный клеточный слой и популяцию крысиных ЭС клеток или линию крысиных ЭС клеток, причем условия культивирования *in vitro* позволяют поддерживать плюрипотентность крысиной ЭС клетки. Дополнительно предлагаются различные способы создания крысиных ЭС клеточных линий. Также предлагается способ отбора генетически модифицированных крысиных ЭС клеток наряду с различными способами создания

трансгенных крыс из генетически модифицированных крысиных ЭС клеток, представленными в настоящем документе. Дополнительно предлагаются различные наборы и изделия.

Неограничивающие варианты реализации настоящего изобретения следующие:

- 5 1. Выделенная крысиная ЭС клетка из линии, выбранной из ACI или DA, где выделенная крысиная ЭС клетка способна передавать свой геном через зародышевую линию.
2. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 1, отличающаяся тем, что указанная клетка получена от крысы  
10 линии ACI.
3. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 1 или 2, отличающаяся тем, что указанная клетка получена от крысы линии Dark Agouti (DA).2.
4. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации  
15 настоящего изобретения 1, 2 или 3, отличающаяся тем, что указанная клетка является эуплоидной и способна передавать целевую генетическую модификацию через зародышевую линию.
5. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 4, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка имеет  
20 эффективность трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации по меньшей мере 3%.
6. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 4, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка имеет  
25 эффективность трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации по меньшей мере 60%.
7. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-6, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка демонстрирует  
целевую эффективность гомологичной рекомбинации по меньшей мере 2%.
8. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации  
30 настоящего изобретения 1-8, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка способна к передаче целевой генетической модификации потомству после очередного цикла электропорации.
9. Выделенные крысиные ЭС клетки в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-8, отличающиеся тем, что крысиная ЭС клетка содержит  
35 одну или более, две или более или три или более целевых генетических модификаций.
10. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 4-9, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация представляет собой инсерцию, делецию, нокаут, нокин, точечную мутацию или их комбинацию.
- 40 11. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 9, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация представляет собой по меньшей мере одну инсерцию гетерологичного полинуклеотида в геном клетки.
12. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации  
45 настоящего изобретения  
11, отличающаяся тем, что гетерологичный полинуклеотид содержит селективный маркер.
13. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации

настоящего изобретения

12, отличающаяся тем, что (а) селективный маркер содержит неослабленный ген селективного маркера, функционально связанный с промотором; или (b) крысиная ЭС клетка содержит по меньшей мере 2 копии полинуклеотида, кодирующего селективный маркер.

14. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 12, отличающаяся тем, что селективный маркер имеет повышенную активность по сравнению с селективным маркером дикого типа.

15. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-14, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка образует сфероподобную колонию при посеве на фидерный клеточный слой в культуре, содержащей полипептид LIF, ингибитор GSK3 и ингибитор MEK.

16. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-15, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка, при культивации *in vitro*, свободно прикрепляются к фидерному клеточному слою.

17. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-16, отличающаяся тем, что для поддержания плюрипотентности указанной клетки нет необходимости в паракринной сигнализации LIF.

18. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-17, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой мужскую (XY) крысиную ЭС клетку.

19. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-19, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой женскую (XX) крысиную ЭС клетку.

20. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-19, отличающаяся тем, что крысиную ЭС клетку можно пересеивать до по меньшей мере 11 раз в среде, содержащей ингибитор GSK3 и ингибитор MEK, без снижения ее целевой эффективности или эффективности трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации.

21. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-20, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности, выбранный из Dnmt3L, Eras, Err-бета, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF-рецептора, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1 или их комбинации.

22. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-21, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более маркеров плюрипотентности, выбранных из c-Myc, Ecat1, Rexo1 или их комбинации.

23. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-22, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более мезодермальных маркеров, выбранных из Brachyury, Vmpr2 или их комбинации.

24. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-23, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более эндодермальных маркеров, выбранных из Gata6, Sox17, Sox7 или их комбинации.

25. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации

настоящего изобретения 1-24, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более нейронных маркеров, выбранных из Nestin, Pax6 или их комбинации.

26. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-25, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует маркер плюрипотентности, включающий Oct-4, Sox2, щелочную фосфатазу или их комбинацию.

27. Выделенная крысиная ЭС клетка в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-26, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка характеризуется экспрессией одного или более крысиных ЭСК-специфических генов, выбранных из одного или более: белка, связанного с адгезионными контактами (Ajar1), клаудина 5 (Cldn5), фактора 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы IV (Camk4), эфрина-A1 (Efnal), EPH рецептора A4 (Epha4), белка бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белка 1, подобного белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкина 36 бета (Il1f8), рецептора альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактора 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептора фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептора 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейронального рецептора пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазы нерецепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокса 2 каудального типа (Cdx2), повторных доменов 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактора 1, связывающего лимфоидный энхансер (Lef1), гена 3, подобного Sal (дрозофила) (Sal13), гомеобокса 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинации.

28. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток, отличающаяся тем, что по меньшей мере 70% крысиных ЭС клеток являются зуплоидными и образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*.

29. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 28, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки получены от крысы линии ACI.

30. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 28, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки получены от крысы линии Dark Agouti (DA).

31. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-30, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки способны передавать свой геном через зародышевую линию.

32. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-31, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки имеют эффективность трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации по меньшей мере 3%.

33. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-31, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки имеют эффективность трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации по меньшей мере 60%.

34. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-31, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки демонстрируют целевую эффективность гомологичной рекомбинации по меньшей мере

2%.

35. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-34, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки способны передавать целевую генетическую модификацию потомству после очередного цикла электропорации.

36. Выделенная популяция в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-35, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки содержат одну или более, две или более или три или более целевых генетических модификаций и могут передавать целевую генетическую модификацию через зародышевую линию.

37. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 36, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация находится в локусе Rosa26 крысы.

38. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 36, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация представляет собой инсерцию, делецию, нокаут, нокин, точечную мутацию или их комбинацию.

39. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 36, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация содержит по меньшей мере одну инсерцию гетерологичного

полинуклеотида в геном клетки.

40. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 39, отличающаяся тем, что гетерологичный полинуклеотид содержит селективный маркер.

41. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 40, отличающаяся тем, что

(а) селективный маркер содержит неослабленный ген селективного маркера, функционально связанный с промотором; или

(б) крысиная ЭС клетка содержит по меньшей мере 2 копии полинуклеотида, кодирующего селективный маркер.

42. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 40, отличающаяся тем, что селективный маркер имеет повышенную активность по сравнению с селективным маркером дикого типа.

43. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-42, отличающаяся тем, что указанные клетки образуют сфероподобную колонию при посеве на фидерный клеточный слой в культуре, содержащей полипептид LIF, ингибитор GSK3 и ингибитор MEK.

44. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-43, отличающаяся тем, что указанные клетки при культивации *in vitro* свободно прикрепляются к фидерному клеточному слою.

45. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-44, отличающаяся тем, что указанные клетки для поддержания плюрипотентности не требуют паракриной сигнализации LIF.

46. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-44, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки представляют собой мужские (XY) крысиные ЭС клетки.

47. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-44, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки представляют собой женские (XX) крысиные ЭС клетки.

48. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-47, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки можно пересевать до по меньшей мере 11 раз в среде, содержащей ингибитор GSK3 и ингибитор MEK, без снижения ее целевой эффективности или эффективности трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации.

49. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-48, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности, выбранный из Dnmt3L, Eras, Err-бета, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF-рецептора, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1 или их комбинации.

50. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-49, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более маркеров плюрипотентности, выбранных из c-Myc, Ecat1, Rexo1 или их комбинации.

51. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-50, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более мезодермальных маркеров, выбранных из Brachyury, Vmpr2 или их комбинации.

52. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-51, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более эндодермальных маркеров, выбранных из Gata6, Sox17, Sox7 или их комбинации.

53. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-52, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более нейронных маркеров, выбранных из Nestin, Pax6 или их комбинации.

54. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым вариантом реализации настоящего изобретения 28-53, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки экспрессируют маркер плюрипотентности, включающий Oct-4, Sox2, щелочную фосфатазу или их комбинацию.

55. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-54, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки характеризуются экспрессией одного или более крысиных ЭСК-специфических генов, выбранных из одного или более: белка, связанного с адгезионными контактами (Ajar1), клаудина 5 (Cldn5), фактора 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы IV (Camk4), эфрина-A1 (Efna1), EPH рецептора A4 (Epha4), белка бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белка 1, подобного белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкина 36 бета (Il1f8), рецептора альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактора 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептора фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептора 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейронального рецептора пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазы нерцепторного типа 18 (Ptrn18), гомеобокса 2 каудального типа (Cdx2), повторных доменов 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (FoxE1), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактора 1, связывающего лимфоидный энхансер (Lef1), гена 3, подобного Sal (дрозофила) (Sal13), гомеобокса 1 SATB (Satb 1), miR-632 или их комбинации.

56. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-55, отличающаяся тем, что популяция содержит по меньшей мере 104 клеток.

57. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-56, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки имеют одну или более характеристик, включающих:

- a. по меньшей мере 90% крысиных ЭС клеток являются эуплоидными;
- b. по меньшей мере 70% крысиных ЭС клеток экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности; причем по меньшей мере один маркер плюрипотентности представляет собой Oct-4, Sox2, щелочную фосфатазу или их комбинацию;
- c. клетка из популяции крысиных ЭС клеток при объединении с крысиным эмбрионом-хозяином передает геном линии крысиных ЭС клеток потомству;
- d. крысиные ЭС клетки при культивации *in vitro* свободно прикрепляются к фидерному клеточному слою;
- e. крысиные ЭС клетки образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*; (f) крысиные ЭС клетки сохраняют плюрипотентность при культивации *in vitro* в средах, содержащих ингибитор GSK3, ингибитор MEK, LIF и фидерный клеточный слой, который не является генетически модифицированным для экспрессии LIF;
- f. крысиная ЭС клетка демонстрирует целевую эффективность гомологичной рекомбинации по меньшей мере 2%;
- g. крысиные ЭС клетки сохраняют плюрипотентность *in vitro* без потребности в паракринной сигнализации LIF;
- h. по меньшей мере 70% крысиных ЭС клеток являются эуплоидными и образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*;
- i. крысиные ЭС клетки экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности, выбранный из Dnmt3L, Eras, Err-бета, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF-рецептора, Lin28, Nanog, Oct4, Sox 15, Sox2, Utf1 или их комбинации;
- j. крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более маркеров дифференциации, выбранных из c-Myc, Ecat 1, Rexo 1;
- k. крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более мезодермальных маркеров, выбранных из Brachyury, Vmpr2 или их комбинации;
- l. крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более эндодермальных маркеров, выбранных из Gata6, Sox17, Sox7 или их комбинации; и/или
- m. крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более нейронных маркеров, выбранных из Nestin, Pax6 или их комбинации.

58. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 28-57, отличающаяся тем, что (a) крысиные ЭС клетки получены из бластоцисты крысы; (b) крысиная ЭС клетка получена из эмбриона крысы на стадии морулы; и/или (c) линия крысиных ЭС клеток получена от крысы с суперовуляцией.

59. Культура *in vitro*, содержащая фидерный клеточный слой, популяцию крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток и среду, содержащую фактор ингибирования лейкемии (LIF), ингибитор GSK3, и ингибитор MEK, причем по меньшей мере 70% крысиных ЭС клеток являются эуплоидными и крысиная ЭС клетка образует сфероподобную колонию.

60. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 59 или 60, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка свободно прикрепляется к

фидерному клеточному слою.

61. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 59, 60 или 61, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки способны передавать свой геном через зародышевую линию.

5 62. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 59, 60 или 61, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки получены от крысы линии ACI.

63. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 59, 60 или 61, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки получены от крысы линии  
10 Dark Agouti (DA). 2.

64. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-63, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки способны передавать целевую генетическую модификацию через зародышевую линию.

65. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения  
15 64, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки имеют эффективность трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации по меньшей мере 3%.

66. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 64, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки имеют эффективность трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации по меньшей мере 60%.

20 67. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-66, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки демонстрируют целевую эффективность гомологичной рекомбинации по меньшей мере 2%.

68. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-67, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка способна к передаче  
25 целевой генетической модификации потомству после очередного цикла электропорации.

69. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-68, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка содержит одну или более, две или более или три или более целевых генетических модификаций.

70. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения  
30 69, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация представляет собой инсерцию, делецию, нокаут, нокин, точечную мутацию или их комбинацию.

71. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 69, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация содержит по меньшей мере одну инсерцию гетерологичного полинуклеотида в геном клетки.

35 72. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 71, отличающаяся тем, что гетерологичный полинуклеотид содержит селективный маркер.

73. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 72, отличающаяся тем, что (а) селективный маркер содержит неослабленный ген  
40 селективного маркера, функционально связанный с промотором; или (b) крысиная ЭС клетка содержит по меньшей мере 2 копии полинуклеотида, кодирующего селективный маркер.

74. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 72, отличающаяся тем, что селективный маркер имеет повышенную активность по  
45 сравнению с селективным маркером дикого типа.

75. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-74, отличающаяся тем, что для поддержания плюрипотентности указанной клетки нет необходимости в паракринной сигнализации LIF.

76. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-75, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой мужскую (XY) крысиную ЭС клетку.

5 77. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-75, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой женскую (XX) крысиную ЭС клетку.

78. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-77, отличающаяся тем, что крысиную ЭС клетку можно пересеивать до по меньшей мере 11 раз в среде, содержащей ингибитор GSK3 и ингибитор MEK без  
10 снижения ее целевой эффективности или эффективности трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации.

79. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-78, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности, выбранный из Dnmt3L, Eras, Egr-бета,  
15 Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF-рецептора, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1 или их комбинации.

80. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-79, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более маркеров плюрипотентности, выбранных из c-Myc, Ecat1, Rexo1 или их  
20 комбинации.

81. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-80, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более мезодермальных маркеров, выбранных из Brachyury, Vmpr2 или их комбинации.

82. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-81, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более эндодермальных маркеров, выбранных из Gata6, Sox17, Sox7 или их  
25 комбинации;

83. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-82, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более нейронных маркеров, выбранных из Nestin, Pax6 или их комбинации.  
30

84. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-83, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует маркер плюрипотентности, включающий Oct-4, Sox2, щелочную фосфатазу или их комбинацию.

85. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-84, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки характеризуются экспрессией одного или более крысиных ЭСК-специфических генов, выбранных из одного или более: белка, связанного с адгезионными контактами (Ajar1), клаудина 5 (Cldn5), фактора 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы IV (Camk4), эфрина-A1 (Efna1), EPH рецептора A4 (Epha4),  
40 белка бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белка 1, подобного белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкина 36 бета (Il1f8), рецептора альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактора 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептора фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептора 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейронального рецептора пентраксина (Ntm),  
45 протеинтирозинфосфатазы нерецепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокса 2 каудального типа (Cdx2), повторных доменов 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции

2) (Foxe1), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактора 1, связывающего лимфоидный энхансер (Lef1), гена3, подобного Sal (дрозофила) (Sal13), гомеобокса 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинации.

5 86. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-84, отличающаяся тем, что концентрация LIF составляет от 50 Ед/мл до 150 Ед/мл.

87. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-85, отличающаяся тем, что концентрация LIF составляет 100 Ед/мл.

10 88. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-87, отличающаяся тем, что LIF получен от мыши или имеет по меньшей мере 92% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

89. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-88, отличающаяся тем, что крысиная ЭС клетка способна поддерживать плюрипотентность без потребности в паракринной сигнализации LIF.

15 90. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-89, отличающаяся тем, что фидерный клеточный слой не модифицирован генетически для экспрессии LIF.

91. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-90, отличающаяся тем, что фидерный клеточный слой содержит монослой  
20 митотически инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ).

92. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-91, отличающаяся тем, что ингибитор MEK представляет собой PD0325901.

25 93. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-92, отличающаяся тем, что ингибитор GSK-3 представляет собой CHIR99021.

94. Культура *in vitro* в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 59-93, отличающаяся тем, что популяция крысиных ЭС клеток получена из эмбриона крысы на стадии бластоцисты или эмбриона крысы на стадии морулы.

30 95. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 94, отличающаяся тем, что эмбрион крысы на стадии бластоцисты или на стадии морулы дополнительно содержит разрастание аморфной недифференцированной массы крысиных ЭС клеток.

35 96. Культура *in vitro* в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 94, отличающаяся тем, что популяция крысиных ЭС клеток содержит изолированное разрастание аморфной недифференцированной массы крысиных ЭС клеток.

40 97. Способ создания линии крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток, включающий: (а) культивирование *in vitro* первого фидерного клеточного слоя и эмбриона крысы на стадии морулы или бластоцисты, где у эмбриона крысы на стадии морулы или бластоцисты была удалена блестящая оболочка яйцеклетки, и где условия культивирования сохраняют плюрипотентность крысиной ЭС клетки и содержат среду с мышинным фактором ингибирования лейкемии (LIF) или последовательностью, имеющей по меньшей мере 91% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и имеющей активность LIF, и с ингибитором GSK3, и ингибитором MEK ; и, (b) перенос  
45 разрастания аморфной недифференцированной массы крысиных ЭС клеток в лунку для культивирования *in vitro*, содержащую второй фидерный клеточный слой, и культивирование разрастания в условиях, включающих среду с мышинным LIF или активным вариантом мышинового LIF, поддерживая тем самым плюрипотентность

крысиных ЭС клеток и создавая линию крысиных ЭС клеток.

98. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 97, отличающийся тем, что линию крысиных ЭС клеток пересевают по меньшей мере 5 раз.

5 99. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 97 или 98, отличающийся тем, что линию крысиных ЭС клеток пересевают по меньшей мере 10 раз.

100. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 97, 98 или 99, отличающийся тем, что среда содержит от около 50 Ед/мл до около 150 Ед/мл  
10 мышинового LIF.

101. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 97-100, отличающийся тем, что среда содержит около 100 Ед/мл мышинового LIF.

102. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 97-101, отличающийся тем, что фидерный клеточный слой не модифицирован генетически  
15 для экспрессии LIF.

103. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 97-102, отличающийся тем, что фидерный клеточный слой содержит монослой митотически инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ).

104. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения  
20 97-103, отличающийся тем, что ингибитор MEK представляет собой PD0325901.

105. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 97-104, отличающийся тем, что ингибитор GSK-3 представляет собой CHIR99021.

106. Способ в соответствии с любым вариантом реализации настоящего изобретения 97-105, отличающийся тем, что (а) линия крысиных ЭС клеток получена от крыс линии  
25 AC1 или получена от крыс линии Dark Agouti (DA); (b) линия крысиных ЭС клеток получена от эмбриона крысы на стадии морулы или на стадии бластоцисты; и/или, (с) линия крысиных ЭС клеток получена от эмбриона на стадии морулы или на стадии бластоцисты от крысы с суперовуляцией.

107. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения  
30 97-106, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит по меньшей мере один из: ингибитора рецептора FGF, ингибитора ROCK или ингибитора ALK.

108. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 107, отличающийся тем, что ингибитор рецептора FGF представляет собой PD184352, ингибитор ROCK представляет собой Y-27632 или ингибитор ALK представляет собой  
35 A-83-01.

109. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 97-108, отличающийся тем, что по меньшей мере одна крысиная ЭС клетка имеет эффективность трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации по меньшей мере 3%.

40 110. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 97-109, отличающийся тем, что эффективность трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации составляет по меньшей мере 60%.

111. Способ отбора крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток, имеющих стабильно включенный в геном гетерологичный полинуклеотид, включающий: (а)  
45 предоставление *in vitro* популяции крысиных ЭС клеток; (b) введение по меньшей мере в одну крысиную ЭС клетку гетерологичного полинуклеотида, содержащего селективный маркер, функционально связанный с промотором, активным в крысиной ЭС клетке; и (с) культивирование *in vitro* популяции крысиных ЭС клеток попеременно

в первой и второй культуральной среде, причем первая культуральная среда содержит эффективное количество селективного агента в течение первого периода времени, а вторая культуральная среда не содержит селективного агента, причем условия культивирования *in vitro* являются достаточными для сохранения плюрипотентности; тем самым обеспечивая отбор крысиных ЭС клеток, имеющих стабильно включенный в их геном гетерологичный полинуклеотид.

112. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 111, отличающийся тем, что чередование первой и второй культуральной среды проводят каждые 24 часа.

113. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 111 или 112, отличающийся тем, что селективный маркер придает устойчивость к антибиотику.

114. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 111-113, отличающийся тем, что антибиотик представляет собой G418.

115. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 111-114, отличающийся тем, что селективный маркер представляет собой неомисинфосфотрансферазу ( $neo^r$ ), гигромицин-В фосфотрансферазу ( $hyg^r$ ), пурамицин-М-ацетилтрансферазу ( $puro^r$ ), бластицидин-S дезаминазу ( $bsr^r$ ), ксантин/гуанин фосфорибозилтрансферазу ( $gpt$ ) и тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-k) или их комбинацию.

116. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 111-115, отличающийся тем, что (а) селективный маркер имеет повышенную активность по сравнению с селективным маркером дикого типа; и/или (b) множество копий селективного маркера стабильно введены в геном крысиной ЭС клетки.

117. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 116, отличающийся тем, что селективный маркер представляет собой не ослабленный селективный маркер.

118. Способ генетической модификации выделенной крысиной эмбриональной стволовой (ЭС) клетки, включающий введение в геном выделенной крысиной ЭС клетки в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-58 гетерологичного полинуклеотида для получения генетически модифицированной крысиной ЭС клетки.

119. Способ получения генетически модифицированной крысы, включающий:

(а) введение в геном выделенной крысиной эмбриональной стволовой (ЭС) клетки в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 1-58 гетерологичного полинуклеотида для получения крысиной ЭС клетки с генетической модификацией;

(b) введение по меньшей мере одной из крысиных ЭС клеток, имеющих целевую генетическую модификацию, в крысиный эмбрион-хозяин для получения эмбриона F0;

(с) имплантацию эмбриона F0 суррогатной матери;

(d) созревание эмбриона F0 в организме суррогатной матери до соответствующего срока; и (e) идентификацию крысы F0, имеющей целевую генетическую модификацию.

120. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 119, дополнительно включающий скрещивание самцов крыс F0 с самками крыс дикого типа с получением потомства F1, являющегося гетерозиготным по целевой генетической модификации.

121. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 120, дополнительно включающий скрещивание самцов крыс F0 с самками крыс дикого типа

с получением потомства F1, являющегося гетерозиготным по целевой генетической модификации.

122. Способ в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения 119, дополнительно включающий скрещивание самцов крыс потомства F1 с самками крыс потомства F1 с получением потомства F2, являющегося гомозиготным по генетической модификации.

123. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 119-122, отличающийся тем, что по меньшей мере 3% крыс F0, имеющих генетическую модификацию, передают эту генетическую модификацию потомству F1.

124. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 119-123, отличающийся тем, что по меньшей мере 10% крыс F0, имеющих генетическую модификацию, передают эту генетическую модификацию потомству F1.

125. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 119-124, отличающийся тем, что по меньшей мере 60% крыс F0, имеющих генетическую модификацию, передают эту генетическую модификацию потомству F1.

126. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 119-125, отличающийся тем, что генетически модифицированная крысиная ЭС клетка получена из той же линии крыс, что и крысиный эмбрион-хозяин.

127. Способ в соответствии с любым из вариантов реализации настоящего изобретения 119-127, отличающийся тем, что генетически модифицированная крысиная ЭС клетка получена из линии крыс, отличной от той, к которой принадлежит крысиный эмбрион-хозяин.

128. Выделенная популяция крысиных ЭС клеток по любому из предшествующих пунктов, культивирование *in vitro* по любому из предшествующих пунктов или способ по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что крысиные ЭС клетки в популяции содержат следующее:

(a) по меньшей мере 90% крысиных ЭС клеток являются эуплоидными;

(b) по меньшей мере 70% крысиных ЭС клеток экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности; причем по меньшей мере один маркер плюрипотентности представляет собой Oct-4, Sox2, щелочную фосфатазу или их комбинацию;

(c) клетка из популяции крысиных ЭС клеток при объединении с крысиным эмбрионом-хозяином передает геном линии крысиных ЭС клеток потомству;

(d) крысиные ЭС клетки при культивации *in vitro* свободно прикрепляются к фидерному клеточному слою;

(e) крысиные ЭС клетки образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*;

(f) крысиные ЭС клетки сохраняют плюрипотентность при культивации *in vitro* в средах, содержащих ингибитор GSK3, ингибитор MEK, LIF и фидерный клеточный слой, который не является генетически модифицированным для экспрессии LIF;

(g) крысиная ЭС клетка демонстрирует целевую эффективность гомологичной рекомбинации по меньшей мере 2%;

(h) крысиные ЭС клетки сохраняют плюрипотентность *in vitro* без потребности в паракринной сигнализации LIF;

(i) по меньшей мере 70% крысиных ЭС клеток являются эуплоидными и образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*;

(j) крысиные ЭС клетки экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности, выбранный из Dnmt3L, Eras, Err-бета, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF-рецептора, Lin28, Nanog, Oct4, Sox 15, Sox2, Utf1 или их комбинации;

(к) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более маркеров дифференциации, выбранных из *c-Myc*, *Ecat 1*, *Rex1*.

(l) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более мезодермальных маркеров, выбранных из *Brachyury*, *Vmpg2* или их комбинации;

5 (m) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более эндодермальных маркеров, выбранных из *Gata6*, *Sox17*, *Sox7* или их комбинации; и/или

(n) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более нейронных маркеров, выбранных из *Nestin*, *Rax6* или их комбинации.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

10 Файл настоящего патента или заявки содержит по меньшей мере один цветной рисунок. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветным рисунком (рисунками) будут предоставлены Управлением по запросу и после оплаты необходимой пошлины.

На ФИГ. 1 изображены кЭСК, растущие в виде компактных сферических колоний, 15 которые обычно не прикреплены и плавают в чашке для культивирования.

На ФИГ. 2A-D изображены различные маркеры плюрипотентности, экспрессируемые кЭСК: на А изображен *Oct-4* (зеленый); на В изображен *Sox-2* (красный); на С изображен *DAPI* (голубой); на D изображено наложение маркеров плюрипотентности, экспрессируемых кЭСК.

20 На ФИГ. 3 показано, что кЭСК экспрессируют слабые уровни щелочной фосфатазы (маркер плюрипотентности) (слева) и кариотип для линии DA.2B представляет собой 42X,Y (справа). Кариотипирование выполняли потому что кЭСК часто становятся тетраплоидными; таким образом, был проведен предварительный скрининг линий 25 путем подсчета препаратов метафазных хромосом, и линии в основном с нормальными количествами были затем кариотипированы по соответствующей форме.

На ФИГ. 4 показан вид вблизи кЭСК, представленных на ФИГ. 1.

На ФИГ. 5 изображено получение химер путем инъекций бластоцисты и передачи генома кЭСК через зародышевую линию; химеры, произведенные посредством инъекций 30 бластоцисты с использованием родительских AC1.G1 кЭСК; у высокого процента химер, как правило, морды альбиносов.

На ФИГ. 6 изображены детеныши агутти F1 из помета с альбиносами, произведенными от химеры AC1/SD, помеченной звездочкой (\*) на ФИГ. 5.

На ФИГ. 7 на панели А изображено нацеливание на крысиный локус *Rosa 26*, который находится между генами *Setd5* и *Thumpd3* как и у мыши, на том же расстоянии. На 35 панели А показана структура мышинового локуса *Rosa 26*. Транскрипты *mRosa26* состоят из 2 или 3 экзонов. На панели В показана структура локуса *rRosa26*; крысиный локус содержит второй экзон 1 (*Ex1b*) в дополнение к гомологичному экзону мышинового экзона 1 (*Ex1a*); у крыс не был выявлен третий экзон. На панели С показан целевой аллель *rRosa26*; группы гомологии по 5 тысяч оснований каждая клонировали с помощью 40 ПЦР с использованием геномной ДНК от кЭСК DA; целевой аллель содержит кассету SA-lacZ-hUB-neo замещающую делецию 117 п.о. в интроне *rRosa26*.

На ФИГ. 8А изображен контрольный мозг 14-недельных крыс дикого типа, которых лечили X-gal. В контрольном мозге продемонстрирован низкий уровень фонового окрашивания в отношении *LacZ* (вид сзади).

45 На ФИГ. 8В изображена экспрессия *LacZ* в мозге гетерозиготных крыс *rRosa26* (в возрасте 14 недель). Репортер *lacZ* экспрессировался повсеместно в мозге гетерозиготной крысы *rRosa26*.

На ФИГ. 8С изображены контрольное сердце и тимус (вставка) 14-недельной крысы

дикого типа, которую лечили X-gal. В контрольном сердце и тимусе продемонстрирован низкий уровень фоновое окрашивания в отношении LacZ.

На ФИГ. 8D изображена экспрессия LacZ в сердце и тимусе (вставка) гетерозиготной крысы rRosa26 в возрасте 14 недель. Репортер lacZ экспрессировался повсеместно в сердце и тимусе гетерозиготной крысы rROSA26.

На ФИГ. 8E изображено контрольное легкое 14-недельной крысы дикого типа, которую лечили X-gal. В контрольном легком продемонстрирован низкий уровень фоновое окрашивания в отношении LacZ.

На ФИГ. 8F изображена экспрессия LacZ в легком гетерозиготной крысы rRosa26 в возрасте 14 недель. Репортер lacZ экспрессировался повсеместно в легком гетерозиготной крысы rRosa26.

На ФИГ. 8G и H изображена экспрессия LacZ у эмбриона e12.5. В отличие от контрольного эмбриона дикого типа (H), который демонстрирует низкий уровень фоновое окрашивания LacZ, гетерозиготный эмбрион rRosa26 демонстрирует повсеместную экспрессию репортера LacZ по всему эмбриону.

На ФИГ. 8I и J изображена экспрессия LacZ у эмбриона e14.5. В отличие от контрольного эмбриона дикого типа (J), который демонстрирует низкий уровень фоновое окрашивания LacZ, гетерозиготный эмбрион rRosa26 крысы демонстрирует повсеместную экспрессию репортера LacZ по всему эмбриону.

На Фиг. 9A-B представлена фотография, демонстрирующая анализ числа хромосом в линии ЭС клеток крыс AC1.G1.

На Фиг. 10A-B представлена фотография, демонстрирующая анализ числа хромосом в линии ЭС клеток крыс DA.2B.

На Фиг. 11A-B представлена фотография, демонстрирующая анализ числа хромосом в линии крысиных ЭС клеток DA.C2.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ниже более подробно описаны настоящие способы и композиции со ссылкой на прилагаемые рисунки, на которых показаны некоторые, но не все, варианты реализации способов и композиций данного изобретения. Действительно, эти способы и композиции могут быть реализованы во многих различных формах и не должны быть истолкованы как ограниченные вариантами реализации настоящего изобретения, изложенными в данном документе; скорее эти варианты реализации настоящего изобретения представлены таким образом, что это описание будет удовлетворять соответствующим требованиям законодательства. Одинаковые номера относятся к одинаковым элементам по всему описанию.

Многие модификации и другие варианты реализации способов и композиций, изложенные в настоящем документе, будут очевидны специалистам в той области техники, к которой эти способы и композиции относятся, с преимуществом идей изобретения, представленных в изложенном выше описании и сопутствующих рисунках. Таким образом, следует понимать, что способы и композиции не должны быть ограничены конкретными раскрытыми вариантами реализации настоящего изобретения и что модификации и другие варианты реализации настоящего изобретения включены в объем прилагаемой формулы изобретения. Хотя в данном документе используются конкретные термины, они используются только в общем и описательном смысле, а не для целей ограничения.

#### I. Общие сведения

Крысы уже давно являются предпочтительными организмами моделей грызунов в нескольких областях биомедицинских исследований, таких как сердечно-сосудистые

заболевания, обмен веществ, токсикология, нейробиология и поведение. Были разработаны сотни крысиных линий; некоторые являются отличными моделями сложных заболеваний человека, таких как гипертония, диабет и рак. Однако понимание генетики этих моделей было сильно затруднено из-за сложности модификации генома крыс контролируемым образом. Благодаря использованию сайт-специфических эндонуклеаз можно получать мутации в гене, представляющем интерес, но этот способ остается неточным и дорогостоящим. Нацеливание и передача зародышевой линии крысиных ЭС клеток остается сложной задачей.

В данном документе описано выделение крысиных ЭС клеток (кЭСК) от двух инбредных крысиных линий. Были получены кЭСК от линий DA и ACI. Эти клетки экспрессируют маркеры плюрипотентности и демонстрируют нормальный кариотип 42X,Y. Высокий процент химер был получен посредством микроинъекции в эмбрионы SD-хозяев на стадии бластоцисты, и передача генома кЭСК была продемонстрирована через зародышевую линию для обеих линий. Используя плазмидные нацеливающие векторы, авторы настоящего изобретения разработали целевые мутации в крысином эквиваленте локуса ROSA26 и добились трансмиссии через зародышевую линию целевого аллеля в обеих линиях. Эти гетерозиготные животные экспрессируют lacZ во всех тканях на всех исследованных стадиях.

В различных аспектах ЭС клетки получали от линии ACI, чтобы получить благоприятное количество мужского потомства от ACI-доноров ЭС клеток. В одном варианте реализации изобретения мужское потомство составляет приблизительно 50%.

В различных аспектах ЭС клетки были получены из линии DA, чтобы получить преимущественно потомство женского пола.

## II. Крысиные эмбриональные стволовые (ЭС) клетки

В настоящем документе предлагаются различные композиции и способы, включающие эмбриональные стволовые (ЭС) клетки крысы. Стволовые клетки являются популяцией клеток, которые обладают бесконечной способностью к самообновлению и являются плюрипотентными. «Эмбриональная стволовая клетка», или «ЭС клетка», представляет собой стволовую клетку, полученную из эмбриона или плода. Различные крысиные ЭС клетки, представленные в настоящем документе, могут иметь одно или более из следующих свойств:

- (a) обладают компетентностью зародышевой линии, что означает, что при имплантации крысиной ЭС клетки в крысиный эмбрион-хозяин, геном линии крысиных ЭС клеток передается потомству;
- (b) обладают компетентностью зародышевой линии после по меньшей мере одной целевой генетической модификации, что означает, что при имплантации крысиной ЭС клетки с целевой генетической модификацией в крысиный эмбрион-хозяин целевая генетическая модификация в геноме линии крысиных ЭС клеток передается потомству;
- (c) обладают плюрипотентностью *in vitro*;
- (d) обладают тотипотентностью *in vitro*;
- (e) при культивации *in vitro* свободно прикрепляются к фидерному клеточному слою;
- (f) при культивации *in vitro* образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*;
- (g) сохраняют плюрипотентность при культивации *in vitro* в условиях, включающих фидерный клеточный слой, который не является генетически модифицированным для экспрессии фактора ингибирования лейкемии (LIF), причем культуральная среда содержит достаточную концентрацию LIF;
- (h) сохраняют плюрипотентность при культивации *in vitro* в условиях, включающих

фидерный клеточный слой, причем культуральная среда содержит мышинный LIF или его активный вариант или фрагмент;

(i) имеют молекулярную сигнатуру, которая характеризуется следующим:

i) экспрессией одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, включая белок, связанный с адгезионными контактами (Ajar1), клаудин 5 (Cldn5), фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимую протеинкиназу IV (Camk4), эфрин-A1 (Efna1), EPH рецептор A4 (Epha4), белок бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белок 1, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкин 36 бета (Il1f8), рецептор альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактор 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептор 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейрональный рецептор пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазу нерецепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокс 2 каудального типа (Cdx2), повторные домены 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер (Lef1), ген 3, подобный Sal (дрозофила) (Sal13), гомеобокс 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинацию;

ii) экспрессией по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, включая белок, связанный с адгезионными контактами (Ajar1), клаудин 5 (Cldn5), фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимую протеинкиназу IV (Camk4), эфрин-A1 (Efna1), EPH рецептор A4 (Epha4), белок бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белок 1, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкин 36 бета (Il1f8), рецептор альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактор 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептор 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейрональный рецептор пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазу нерецепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокс 2 каудального типа (Cdx2), повторные домены 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер (Lef1), ген 3, подобный Sal (дрозофила) (Sal13), гомеобокс 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинацию;

iii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 14, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

iv) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 14, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

v) экспрессией одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13;

vi) экспрессией по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13;

vii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

viii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

ix) по меньшей мере 20-кратным снижением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 12, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4; и/или

x) по меньшей мере 20-кратным снижением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 12, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

xi) любой комбинацией экспрессии генов, специфических для крысиных ЭС клеток согласно разделам (i)-(x);

xii) уровнем относительной экспрессии маркеров плюрипотентности, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 перечисленных маркеров плюрипотентности. См. уровни относительной экспрессии в колонке ранжирования плюрипотентности Таблицы 15;

xiii) уровнем относительной экспрессии мезодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3 или 4 перечисленных мезодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке мезодермального ранжирования Таблицы 15;

xiv) уровнем относительной экспрессии эндодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 перечисленных эндодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке эндодермального ранжирования Таблицы 15;

xv) уровнем относительной экспрессии нейронных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2 и 3 перечисленных нейронных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке нейронного ранжирования Таблицы 15;

xvi) уровнем относительной экспрессии трофэктодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для перечисленных трофэктодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке трофэктодермального ранжирования Таблицы 15;

xvii) любым уровнем относительной экспрессии одного или более (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) маркеров плюрипотентности, мезодермальных маркеров, эндодермальных маркеров, нейронных маркеров и/или трофэктодермальных маркеров, приведенных в Таблице 15;

xviii) уровнем относительной экспрессии каждого из маркеров, приведенных в Таблице 15;

xix) любой комбинацией сигнатур, приведенных в пунктах xii-xiix; и/или

xx) любой комбинацией сигнатур, приведенных в пунктах i-xiix;

(j) обладают способностью продуцировать крысу F0;

(k) способны к субкультивированию и поддержанию недифференцированного состояния;

(l) имеют то же количество хромосом, что и клетка нормальной крысы;

(m) сохраняют плюрипотентность *in vitro* без потребности в паракринной

сигнализации LIF; и/или

(n) обладают способностью самообновления, что означает, что они делятся бесконечно, сохраняя плюрипотентность.

Одна или более характеристик, приведенных в пунктах (a)-(n), может присутствовать в выделенной крысиной ЭС клетке, популяции крысиных ЭС клеток или линии крысиных ЭС клеток, представленных в данном документе, причем эти крысиные ЭС клетки не подвергались целевой генетической модификации. В других вариантах реализации изобретения одна или более характеристик, приведенных в пунктах (a)-(n) может присутствовать в выделенной крысиной ЭС клетке, популяции крысиных ЭС клеток или линии крысиных ЭС клеток, представленных в данном документе, имеющих одну или более целевых генетических модификаций. Целевая генетическая модификация содержит изменение в геноме крысиной ЭС клетки и включает, например, инсерцию, делецию, нокаут, нокин, мутацию или их комбинацию. В других случаях целевая генетическая модификация содержит по меньшей мере одну инсерцию гетерологичного полинуклеотида в геном крысиной ЭС клетки. Дополнительное описание таких целевых генетических модификаций представлено в других разделах данного документа.

В специфических вариантах реализации изобретения различные крысиные ЭС клетки и клеточные линии, представленные в данном документе, являются компетентными в отношении зародышевой линии, что означает, что когда крысиную ЭС клетку имплантируют в крысиный эмбрион-хозяин, геном крысиной ЭС клетки передается потомству. Такая трансмиссия потомству (т.е. популяции F1) может произойти в случае, если крысиная ЭС клетка не подвергалась целевой генетической модификации. Кроме того, крысиная ЭС клетка, имеющая целевую генетическую модификацию, также является компетентной в отношении зародышевой линии, что означает, что когда крысиную ЭС клетку, имеющую целевую генетическую модификацию, имплантируют в крысиный эмбрион-хозяин, целевая генетическая модификация крысиной ЭС клетки передается потомству (т.е. популяции F1). Таким образом, в различных аспектах крысиные ЭС клетки и способы, описанные в данном документе, используются для получения высокой частоты или высокой эффективности передачи зародышевой линии генома крысиной клетки как от крысиных ЭС клеток, которые не подвергались целевой генетической модификации, так и от крысиных ЭС клеток, которые подвергались целевой генетической модификации. В различных вариантах реализации изобретения частота передачи зародышевой линии составляет больше чем 1:600, больше чем 1:500, больше чем 1:400, больше чем 1:300, больше чем 1:200 и больше чем 1:100. В различных вариантах реализации изобретения частота передачи зародышевой линии составляет больше чем 1%, больше чем 2%, больше чем 3%, больше чем 4%, больше чем 5%, больше чем 6%, больше чем 7%, больше чем 8%, больше чем 9%, больше чем 10%, до около 16%, больше чем 25%, больше чем 50%, больше чем 60%, больше чем 65%, больше чем 70%, больше чем 75% или больше. В различных вариантах реализации изобретения частота передачи зародышевой линии находится в диапазоне от 9% до 16%. В различных аспектах процент потомства, полученного из донорских кЭСК, в поколении F1 составляет 1% или больше, 2% или больше, 3% или больше, 10% или больше, 20% или больше, 30% или больше, 40% или больше, 50% или больше, 60% или больше, от 3% до около 10% или больше; от 3% или больше до около 63%, от около 10% до около 30%, от около 10% до около 50%, от около 30% до около 70%, от около 30% до около 60%, от около 20% до около 40%, от около 20% до 65% или от около 40% до 70%. Таким образом, крысиная ЭС клетка, представленная в настоящем документе, которая не подвергалась целевой генетической модификации, или, в альтернативном варианте,

крысиная ЭС клетка, имеющая целевую генетическую модификацию, обладает способностью передавать их геном популяции F1.

Крысиная ЭС клетка, которая не подвергалась целевой генетической модификации, или крысиная ЭС клетка, имеющая целевую генетическую модификацию, может быть  
 5 плюрипотентной и/или тотипотентной. Термин «плюрипотентная» или «плюрипотентность» относится к стволовой клетке, которая обладает потенциалом в любом из трех зародышевых слоев: энтодерме, мезодерме или эктодерме. Потентность клетки - это общий термин, который описывает способность дифференцироваться в другие типы клеток. См., например, публикацию Hans et al. (2007). «The Potential of Stem  
 10 Cells: An Inventory»). Human biotechnology as Social Challenge. Ashgate Publishing, Ltd. p.28, включенную в данный документ посредством ссылки. Термин «тотипотентность» или «тотипотентный» представляет способность одной клетки делиться и производить все дифференцированные клетки в организме. См., например, публикацию Western P (2009).  
 15 Int. J. Dev. Biol. 53 (2-3): 393-409, включенную в данный документ посредством ссылки. В специфических вариантах реализации изобретения различные ЭС клетки, описанные в данном документе, могут быть плюрипотентными и/или тотипотентными.

Для определения того, является ли крысиная ЭС клетка плюрипотентной, можно использовать разные способы. Например, можно проводить анализ ЭС клетки на экспрессию различных маркеров плюрипотентности, включая, но не ограничиваясь  
 20 этим, Oct-4, Sox2, щелочную фосфатазу или их комбинацию. См., например, публикации Okamoto, K. et al., Cell, 60: 461-472 (1990), Scholer, H. R. et al., EMBOJ. 9: 2185-2195 (1990)) и Nanog (Mitsui, K. et al., Cell, 113: 631-642 (2003), Chambers, I. et al., Cell, 113: 643-655 (2003) относительно различных анализов на наличие таких маркеров или их уровней. См., также Фигуры 2 и 3, представленные в данном документе. Другие маркеры  
 25 плюрипотентности включают, например, присутствие по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 маркеров плюрипотентности, которые включают Nanog, Klf4, Dppa2, Fgf4, Rex1, Eras, Err-бета и/или Sal13. Другие маркеры плюрипотентности включают, например, отсутствие по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 маркеров плюрипотентности, которые включают T/Brachyury, Flk1, Nodal, Bmp4, Bmp2, Gata6, Sox17, Hhex1, Sox7 и/  
 30 или Pax6.

В специфических вариантах реализации изобретения экспрессию и/или уровень экспрессии этих маркеров можно определить с использованием ОТ-ПЦР. Для определения уровня и/или наличия щелочной фосфатазы доступны различные наборы, в том числе, например, набор для окрашивания ткани ALP tissue staining kit (Sigma) и  
 35 набор Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I (Funakoshi) и тому подобное. Дополнительные анализы включают гибридизацию *in situ*, иммуногистохимический анализ, анализ иммунофлюоресценции. В специфических вариантах реализации изобретения крысиная ЭС клетка характеризуется экспрессией по меньшей мере одного маркера плюрипотентности, включая, например, экспрессию Oct-4, Sox2, щелочной  
 40 фосфатазы или их комбинации и предпочтительно всех трех этих маркеров.

Различные крысиные ЭС клетки, представленные в настоящем документе (т.е. крысиные ЭС клетки, которые не подвергались целевой генетической модификации и/или крысиные ЭС клетки, имеющие целевую генетическую модификацию), способны  
 45 сохранять плюрипотентность и/или тотипотентность при поддержании в условиях культивирования *in vitro*. Различные крысиные ЭС клетки, представленные в настоящем документе, в некоторых вариантах реализации изобретения могут быть субкультивированными, все еще сохраняя недифференцированное состояние. Различные способы культивации крысиных ЭС клеток описаны более подробно в других разделах

данного документа.

Крысиные эмбриональные стволовые клетки, представленные в данном документе, были выделены из эмбриона крысы с использованием различных способов выделения, очистки и роста культуры, которые подробно описаны в других разделах данного документа. Используемый в данном документе термин «клетка» относится к отдельным клеткам, клеточным линиям или культурам, полученным из таких клеток. «Выделенная» ЭС клетка крысы или крысиного эмбриона была извлечена из ее природной среды. Термин «выделенный» может означать отсутствие 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% составляющих, с которыми компонент находится в своем естественном состоянии. В данном документе определение «линия крысиных ЭС клеток» означает популяцию выделенных крысиных клеток, которые развивали из одной крысиной ЭС клетки, и, следовательно, популяция клеток в пределах данной клеточной линии имеет единую генетическую структуру, отличную от мутаций или кариотипических изменений, происходящих в процессе культивирования или во время целевых генетических модификаций. Например, как указано в других разделах данного документа, описанные крысиные ЭС клетки характеризуются высоким уровнем эуплоидии. Тем не менее, в некоторых клеточных линиях уровень эуплоидии составляет меньше 100% из-за кариотипических изменений при культивировании линии из одной клетки. Более того, данная популяция крысиных ЭС клеток может содержать по меньшей мере 10 в 3 степени, 10 в 4 степени,  $10 \times 10^4$ ,  $10 \times 10^5$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^7$ ,  $10 \times 10^8$ ,  $10 \times 10^9$  или  $10 \times 10^{10}$  клеток или больше. Некоторые клеточные популяции имеют достаточное количество клеток, что позволяет провести отбор желательной модифицированной клетки, но не слишком большое количество, чтобы уменьшить возможность мутаций или кариотипических изменений, развивающихся в клеточной линии. Например, некоторые популяции клеток имеют от 10 в 3 степени до 10 в 6 степени клеток.

Как описано в других разделах данного документа, для целевой генетической модификации линии крысиных ЭС клеток предлагаются различные способы. При осуществлении таких способов по меньшей мере одна клетка в линии крысиных ЭС клеток содержит целевую генетическую модификацию. С помощью различных способов культивирования и/или отбора получают линии крысиных ЭС клеток, имеющие одну или больше желательных целевых генетических модификаций.

В специфических вариантах реализации изобретения крысиная ЭС клетка, популяция крысиных ЭС клеток или линия крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) являются эуплоидными и, таким образом, имеют число хромосом, кратное гаплоидному числу. В дополнительном варианте реализации изобретения крысиная ЭС клетка, популяция крысиных ЭС клеток или линия крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) являются диплоидными и, таким образом, имеют два гаплоидных набора гомологичных хромосом. При упоминании популяции крысиных ЭС клеток или популяции клеток из данной популяции крысиных ЭС клеток или линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию), по меньшей мере около 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% клеток в данной популяции являются или эуплоидными и/или диплоидными. В других случаях при упоминании популяции крысиных ЭС клеток или популяции клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) по меньшей мере от около 50% до

95%, от около 60% до 90%, от около 60% до 95%, от около 60% до 85%, от около 60% до 80%, от около 70% до 80%, от около 70% до 85%, от около 70% до около 90%, от около 70% до около 95%, от около 70% до около 100%, от около 80% до около 100%, от около 80% до около 95%, от около 80% до около 90%, от около 90% до около 100%, от около 90% до около 99%, от около 90% до около 98%, от около 90% до около 97%, от около 90% до около 95% клеток в данной популяции являются эуплоидными и/или диплоидными.

В дополнительных вариантах реализации изобретения крысиная ЭС клетка, популяция крысиных ЭС клеток или линия крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеют 42 хромосомы. При упоминании популяции крысиных ЭС клеток или популяции клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) по меньшей мере около 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% клеток в данной популяции имеют 42 хромосомы. В других случаях, при упоминании популяции крысиных ЭС клеток или популяции клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию), по меньшей мере от около 50% до 95%, от около 60% до 90%, от около 60% до 95%, от около 60% до 85%, от около 60% до 80%, от около 70% до 80%, от около 70% до 85%, от около 70% до около 90%, от около 70% до около 95%, от около 70% до около 100%, от около 80% до около 100%, от около 80% до около 95%, от около 80% до около 90%, от около 90% до около 100%, от около 90% до около 99%, от около 90% до около 98%, от около 90% до около 97%, от около 90% до около 95% клеток в данной популяции имеют 42 хромосомы.

В дополнительных вариантах реализации изобретения крысиная ЭС клетка, популяция крысиных ЭС клеток или линия крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию), представленные в данном документе, образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*. «Сфероподобная» морфология относится к форме колоний крысиных ЭС клеток в культуре, а не к форме отдельных ЭС клеток. Колонии крысиных ЭС клеток являются сфероподобными. Колонии, свободно прикрепленные к питающим клеткам, являются круглыми (имеют морфологию, подобную кругу). Свободно плавающие колонии являются сфероподобными. Колонии крысиных ЭС клеток являются сфероподобными и очень компактными, что означает, что очень трудно увидеть границы между клетками. Край колонии яркий и четкий. Отдельные ядра трудно различить, потому что клетки очень малы (так что ядро занимает большую часть объема клетки). Мышиные ЭС клетки образуют вытянутые колонии и прочно прикрепляются к питающим клеткам. Морфология мЭСК может изменяться в зависимости от линии; например, колонии В6 более круглые и более куполообразные, чем колонии F1N4, но все еще более удлиненные по сравнению с кЭСК. Колонии ЭС клеток человека более плоские и более распространенные по сравнению с колониями мЭСК. Непосредственно колонии крысиных ЭС не являются плоскими и не похожи на колонии ЭС клеток человека.

В дополнительных вариантах реализации изобретения крысиная ЭС клетка, популяция крысиных ЭС клеток или линия крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеют круглую морфологию. Морфологическая шкала для круга приводится ниже, где оценка

10 представляет идеальный круг, а оценка 1 представляет эллипс.

Морфологическая шкала круга:

10 = Круг со структурой, имеющей продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры и имеют одинаковую длину.

5 9 = Структура, имеющая продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры, причем одна ось составляет 0,9999-0,9357 длины другой оси.

8 = Структура, имеющая продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры, причем одна ось составляет 0,9357-0,875 длины другой оси.

10 7 = Структура, имеющая продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры, причем одна ось составляет от 0,875 до около 0,8125 длины другой оси.

6 = Структура, имеющая продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры, причем одна ось составляет 0,8125-0,750 длины другой оси.

15 5 = Структура, имеющая продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры, причем одна ось составляет 0,750-0,6875 длины другой оси.

4 = Структура, имеющая продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры, причем одна ось составляет 0,6875-0,625 длины другой оси.

3 = Структура, имеющая продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры, причем одна ось составляет 0,625-0,5625 длины другой оси.

20 2 = Структура, имеющая продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр круга, причем одна ось составляет 0,5625-0,523 длины другой оси.

1 = Эллипс, который определяется как имеющий продольную ось и вертикальную ось, которые проходят через центр структуры, причем одна ось составляет 0,523-0,500 длины другой оси.

25 В одном неограничивающем варианте реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или популяция клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеют по меньшей мере около 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% клеток в  
30 данной популяции с оценкой по шкале морфологии круга 10, 9 или 8. В других вариантах реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или популяция клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеют по меньшей мере от около 50% до 95%, от около 60% до 90%, от около 60% до 95%, от около 60% до 85%, от около 60% до 80%, от около 70% до 80%, от около 70% до 85%, от около  
35 70% до около 90%, от около 70% до около 95%, от около 70% до около 100%, от около 80% до около 100%, от около 80% до около 95%, от около 80% до около 90%, от около 90% до около 100%, от около 90% до около 99%, от около 90% до около 98%, от около 90% до около 97%, от около 90% до около 95% клеток в данной популяции с оценкой  
40 по шкале морфологии круга 10, 9 или 8.

В другом неограничивающем варианте реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или популяция клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеют по меньшей мере около 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%,  
45 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% клеток в данной популяции с оценкой по шкале морфологии круга 7, 6, 5, 4 или 3. В других неограничивающих вариантах реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или популяция клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались

целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеют по меньшей мере от около 50% до 95%, от около 60% до 90%, от около 60% до 95%, от около 60% до 85%, от около 60% до 80%, от около 70% до 80%, от около 70% до 85%, от около 70% до около 90%, от около 70% до около 95%, от около 70% до  
 5 около 100%, от около 80% до около 100%, от около 80% до около 95%, от около 80% до около 90%, от около 90% до около 100%, от около 90% до около 99%, от около 90% до около 98%, от около 90% до около 97%, от около 90% до около 95% клеток в данной популяции с оценкой по шкале морфологии круга 7, 6, 5, 4 или 3.

8 дополнительных вариантах реализации изобретения, когда крысиные ЭС клетки  
 10 (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) высевают на фидерный клеточный слой *in vitro*, образуются сфероподобные колонии. Морфологическая шкала для сферы приводится ниже, где оценка 10 представляет идеальную сферу, а оценка 1 представляет трехмерную эллиптическую структуру.

15 Морфологическая шкала сфероподобной структуры:

10 = Сфера представляет собой структуру, имеющую ось X, ось Y и ось Z, каждая из которых проходит через центр структуры, и которые имеют одинаковую длину.

9 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,9999 до 0,9357 длины по  
 20 меньшей мере одной из других осей.

8 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,9357 до 0,875 длины по меньшей мере одной или двух других осей.

7 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр  
 25 структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,875 до 0,8125 длины по меньшей мере одной или двух других осей.

6 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,8125 до 0,750 длины по  
 30 меньшей мере одной или двух других осей.

5 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр  
 структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,750 до 0,6875 длины по  
 35 меньшей мере одной или двух других осей.

4 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,6875 до 0,625 длины по  
 40 меньшей мере одной или двух других осей.

3 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,625 до 0,5625 длины по  
 45 меньшей мере одной или двух других осей.

2 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,5625 до 0,523 длины по  
 50 меньшей мере одной или двух других осей.

1 = Структура, имеющая ось X, ось Y и ось Z, которые проходят через центр структуры, причем одна из указанных осей составляет от 0,523 до 0,500 длины по  
 55 меньшей мере одной или двух других осей.

В одном неограничивающем варианте реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или популяция клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеет по меньшей мере около 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% колоний, образованных при посеве клеток на фидерный клеточный слой *in vitro*, с оценкой по шкале сфероподобной морфологии 10, 9 или 8. В других вариантах реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или популяция клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеет по меньшей мере от около 50% до 95%, от около 60% до 90%, от около 60% до 95%, от около 60% до 85%, от около 60% до 80%, от около 70% до 80%, от около 70% до 85%, от около 70% до около 90%, от около 70% до около 95%, от около 70% до около 100%, от около 80% до около 100%, от около 80% до около 95%, от около 80% до около 90%, от около 90% до около 100%, от около 90% до около 99%, от около 90% до около 98%, от около 90% до около 97%, от около 90% до около 95% колоний, образованных при посеве клеток на фидерный клеточный слой *in vitro* с оценкой по шкале сфероподобной морфологии 10, 9 или 8.

В другом неограничивающем варианте реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или популяция клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеет по меньшей мере около 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% колоний, образованных при посеве клеток на фидерный клеточный слой *in vitro*, с оценкой по шкале сфероподобной морфологии 7, 6, 5, 4 или 3. В других вариантах реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или популяция клеток из данной линии крысиных ЭС клеток (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию) имеет по меньшей мере от около 50% до 95%, от около 60% до 90%, от около 60% до 95%, от около 60% до 85%, от около 60% до 80%, от около 70% до 80%, от около 70% до 85%, от около 70% до около 90%, от около 70% до около 95%, от около 70% до около 100%, от около 80% до около 100%, от около 80% до около 95%, от около 80% до около 90%, от около 90% до около 100%, от около 90% до около 99%, от около 90% до около 98%, от около 90% до около 97%, от около 90% до около 95% колоний, образованных при посеве клеток на фидерный клеточный слой *in vitro*, с оценкой по шкале сфероподобной морфологии 7, 6, 5, 4 или 3.

Данная крысиная ЭС клетка, популяция крысиных ЭС клеток или линия крысиных ЭС клеток, представленная в настоящем документе, может быть мужской (XY) крысиной ЭС клеткой, мужской (XY) популяцией крысиных ЭС клеток или мужской (XY) линией крысиных ЭС клеток. В других вариантах реализации изобретения популяция крысиных ЭС клеток или линия крысиных ЭС клеток, представленная в данном документе, может быть женской (XX) крысиной ЭС клеткой, женской (XX) популяцией крысиных ЭС клеток или женской (XX) линией крысиных ЭС клеток. Любая такая крысиная ЭС клетка, популяция крысиных ЭС клеток или линия крысиных ЭС клеток может быть эуплоидной и/или диплоидной, как описано выше.

Различные крысиные ЭС клетки, представленные в данном документе, могут происходить от любой линии крыс, включая, но не ограничиваясь этим, линию крыс ACI, линию крыс Dark Agouti (DA), линию крыс Wistar rat, линию крыс LEA, линию крыс Sprague Dawley (SD) или линию крыс Fischer, такую как Fisher F344 или Fisher F6. Различные крысиные ЭС клетки также можно получать из линии, полученной из смеси двух или больше линий, перечисленных выше. В одном варианте реализации изобретения крысиная ЭС клетка получена из линии, выбранной из линии DA и линии ACI. В специфическом варианте реализации изобретения крысиная ЭС клетка получена из

линии ACI. Линия крыс ACI характеризуется наличием черного агути с белым животом и лапами и гаплотипом RT1<sup>av1</sup>. Такие линии являются коммерчески доступными из различных источников, включая Harlan Laboratories. В других вариантах реализации изобретения разные крысиные ЭС клетки получены из линии крыс Dark Agouti (DA),  
 5 которая характеризуется наличием покрова агути и гаплотипом RT1<sup>av1</sup>. Такие крысы являются коммерчески доступными из различных источников, включая Charles River и Harlan Laboratories.

В дополнительном варианте реализации изобретения разные крысиные ЭС клетки, представленные в данном документе, получены из инбредных линий крыс.

В специфических вариантах реализации изобретения линия крысиных ЭС клеток получена от крысы ACI и содержит крысиную ЭС клетку ACI.G1, описанную в данном документе. В другом варианте реализации изобретения линия крысиных ЭС клеток получена от крысы DA и содержит крысиную ЭС клеточную линию DA.2B или крысиную ЭС клеточную линию DA.2C, описанную в настоящем документе.

Данная крысиная ЭС клетка, представленная в настоящем документе, может быть получена из эмбриона крысы на любой стадии развития эмбриона крысы. Типичные стадии развития эмбриона крысы представлены ниже в Таблице 1. Эмбрионы крыс, которые используют для получения крысиных ЭС клеток, могут представлять собой эмбрион на стадии морулы, эмбрион на стадии бластоцисты или эмбрион крысы на стадии развития между эмбрионом на стадии морулы и эмбрионом на стадии бластоцисты. Таким образом, в специфических вариантах реализации изобретения используемый эмбрион крысы находится между стадиями 5 и 7 по Вичи. В других вариантах реализации изобретения используемый эмбрион крысы находится на стадии 5, 6 или 7 по Вичи.

В одном варианте реализации изобретения крысиная ЭС клетка получена из бластоцисты крысы. В других вариантах реализации изобретения крысиная ЭС клетка получена из бластоцисты крысы с суперовуляцией. В других вариантах реализации изобретения крысиные ЭС клетки получают из эмбриона на стадии 8 клеток, который затем культивируют *in vitro* до его развития в эмбрион на стадии морулы, эмбрион на стадии бластоцисты или эмбрион на стадии развития между стадиями 5 и 7 по Вичи либо в эмбрион на стадии 5, 6 или 7 по Вичи. После чего в этот момент время эмбрионы высевали. Эмбрионы на стадии морулы представляют собой компактный шар клеток без внутренней полости. Эмбрионы на стадии бластоцисты имеют видимую внутреннюю полость (бластоцель) и содержат внутреннюю клеточную массу (ВКМ). ВКМ клетки из ЭС клетки.

Таблица 1. Стадии развития эмбриона крысы

Стандартные стадии (Вичи)	Возраст (дни)	Идентификация стадий
		Дробление и бластула
1	1	1 клетка (в маточной трубе)
2	2	2 клетки (в маточной трубе)
3	3	4 клетки (в маточной трубе)

	4	3,25	8-12 клеток (в маточной трубе)
	5	3,5	Морула (в матке)
5	6	4	Ранняя бластоциста (в матке)
	7	5	Свободная бластоциста (в матке)
10			<b>Гастроула</b>
	8	6	Имплантация бластоцисты, с трофобластным конусом и внутренней клеточной массой; разрастание энтодермы (гипобласт)
15	9	6,75	Диплотрофобласт; внутренняя клеточная масса (подвес), покрыта энтодермой
20	10	7,25	Почти полная имплантация; начинается дифференциация подвеса в эмбриональные и экстра-эмбриональные части
	11	7,75	Завершение имплантации; первичный амниотический пузырь; эктоплацентарный конус

25 Дополнительно представлены различные крысиные ЭС клетки (которые не подвергались целевой генетической модификации и/или имеют целевую генетическую модификацию), которые характеризуются следующим.

Крысиная ЭС клетка характеризуется:

30 i) экспрессией одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, включая белок, связанный с адгезионными контактами (Ajar1), клаудин 5 (Cldn5), фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимую протеинкиназу IV (Camk4), эфрин-A1 (Efha1), EPH рецептор A4 (Epha4), белок бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белок 1, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкин 36 бета (Il1f8), рецептор альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактор 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептор 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейрональный рецептор пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазу нерцепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокс 2 каудального типа (Cdx2), повторные домены 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер (Lef1), ген 3, подобный Sal (дрозофила) (Sal13), гомеобокс 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинацию;

45 ii) экспрессией по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, включая белок, связанный с адгезионными контактами (Ajar1), клаудин 5 (Cldn5), фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимую

протеинкиназу IV (Camk4), эфрин-A1 (Efna1), EPH рецептор A4 (Epha4), белок бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белок 1, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкин 36 бета (Il1f8), рецептор альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактор 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептор 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейрональный рецептор пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазу нерцепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокс 2 каудального типа (Cdx2), повторные домены 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственный hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственный hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер (Lef1), ген 3, подобный Sal (дрозофила) (Sal13), гомеобокс 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинацию;

iii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 14, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

iv) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 14, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

v) экспрессией одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13;

vi) экспрессией по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13;

vii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

viii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

ix) по меньшей мере 20-кратным снижением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 12, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4; и/или

x) по меньшей мере 20-кратным снижением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 12, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

xi) любой комбинацией экспрессии генов, специфических для крысиных ЭС клеток согласно пунктам (i)-(x);

xii) уровнем относительной экспрессии маркеров плюрипотентности, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 перечисленных маркеров плюрипотентности. См. уровни относительной экспрессии в колонке ранжирования плюрипотентности Таблицы 15;

xiii) уровнем относительной экспрессии мезодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3 или 4 перечисленных мезодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке мезодермального ранжирования

Таблицы 15;

xiv) уровнем относительной экспрессии эндодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 перечисленных эндодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке эндодермального ранжирования Таблицы 15;

xv) уровнем относительной экспрессии нейронных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2 и 3 перечисленных нейронных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке нейронного ранжирования Таблицы 15;

xvi) уровнем относительной экспрессии трофэктодермальных маркеров, как показано в таблице 15, для перечисленных трофэктодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке трофэктодермального ранжирования Таблицы 15;

xvii) любым уровнем относительной экспрессии одного или более (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) маркеров плюрипотентности, мезодермальных маркеров, эндодермальных маркеров, нейронных маркеров и/или трофэктодермальных маркеров, приведенных в Таблице 15;

xviii) уровнем относительной экспрессии каждого из маркеров, приведенных в таблице 15;

xix) любой комбинацией сигнатур, приведенных в пунктах xii-xiix; и/или

xx) любой комбинацией сигнатур, приведенных в пунктах i-xiix.

В одном варианте реализации изобретения при трансплантации в эмбрион крысы на стадии преморулы крысиная ЭС клетка (которая не подвергалась целевой генетической модификации и/или имеет целевую генетическую модификацию) может вносить вклад по меньшей мере 90% клеток в поколение F0, вносить вклад по меньшей мере 95% клеток в поколение F0, вносить вклад по меньшей мере 96% клеток в поколение F0, вносить вклад по меньшей мере 97% клеток в поколение F0, вносить вклад по меньшей мере 98% клеток в поколение F0 или вносить вклад по меньшей мере 99% клеток в поколение F0.

III. Деривация и культивирование эмбриональных стволовых (ЭС) клеток

Предложены различные способы получения крысиных ЭС клеток, описанных в данном документе. В специфических вариантах реализации изобретения такие способы включают (а) предоставление культуры *in vitro*, содержащей фидерный клеточный слой и популяцию выделенных крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток; (б)

культивирование *in vitro* в условиях, достаточных для поддержания плюрипотентности и/или тотипотентности выделенной крысиной ЭС клетки. Такие способы, таким образом, позволяют культивировать популяцию крысиных ЭС клеток и/или линию крысиных ЭС клеток.

В одном варианте реализации изобретения предложен способ культивирования линии крысиных эмбриональных стволовых клеток. Такие способы включают культивирование *in vitro* фидерного клеточного слоя и линии крысиных ЭС клеток, причем условия культивирования сохраняют плюрипотентность крысиных ЭС клеток и содержат среду с мышинным фактором ингибирования лейкемии (LIF) либо его активным вариантом или фрагментом. Различные способы дополнительно включают пересев и культивирование *in vitro* клеток линии крысиных ЭС клеток, причем каждое последующее культивирование *in vitro* включает культивирование крысиных ЭС клеток на фидерном клеточном слое в условиях, которые сохраняют плюрипотентность крысиных ЭС клеток и содержат среду с мышинным LIF либо его активным вариантом или фрагментом.

## i. Условия культивирования

Культуральная среда, используемая в различных способах и композициях, будет поддерживать крысиные ЭС клетки. Термины «поддержание» и «поддерживать» относятся к стабильному сохранению по меньшей мере одной или больше характеристик или фенотипов крысиных ЭС клеток, описанных в данном документе. Такие фенотипы могут включать поддержание плюрипотентности и/или тотипотентности, морфологии клеток, профилей экспрессии генов и других функциональных характеристик крысиных стволовых клеток, описанных в данном документе. Термин «поддерживать» может также включать культивирование стволовых клеток или увеличение количества культивируемых стволовых клеток. Этот термин также предусматривает условия культивирования, обеспечивающие сохранение плюрипотентности стволовых клеток, в то время как стволовые клетки могут продолжать или не продолжать делиться и увеличиваться в количестве.

Термин «питающая клетка» или «фидерный клеточный слой» относится к культуре клеток, которая растет *in vitro* и секретирует по меньшей мере один фактор в культуральную среду, используемую для поддержания роста другой клетки, представляющей интерес, в культуре. Питающие клетки используются в настоящем изобретении с целью поддержания плюрипотентности крысиных ЭС клеток и, в специфических вариантах реализации изобретения, одной или больше других характеристик или фенотипов, описанных в данном документе. Можно использовать различные питающие клетки, включая, например, мышинные эмбриональные фибробласты, в том числе мышинные эмбриональные фибробласты, полученные между 12-м и 16-м днями беременности. В специфических вариантах реализации изобретения фидерный клеточный слой содержит монослой митотически инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ).

Культуры *in vitro* крысиных ЭС клеток дополнительно содержат эффективное количество фактора ингибирования лейкемии (LIF) либо его активного варианта или фрагмента. Фактор ингибирования лейкемии (LIF) принадлежит к семейству рецепторов IL-6. LIF связывается с гетеродимерным мембранным рецептором, состоящим из LIF-специфических субъединиц, gp190 или LIFR, и субъединицы gp130, которые являются общими с другими членами семейства IL-6. LIF ингибирует дифференциацию эмбриональных стволовых клеток у мышей и вносит вклад в самообновление стволовых клеток. LIF человека и мыши разделяют 79% гомологии последовательности и демонстрируют межвидовую активность. LIF крысы (rtLIF) представляет собой белок массой 22,1 кДа, содержащий 202 аминокислотных остатка, который демонстрирует 91% идентичности аминокислотной последовательности LIF мыши (Takahama et al. 1998). Существуют шесть возможных аспарагин-связанных сайтов гликозилирования (N-гликозилирование), которые являются консервативными среди LIF полипептидов от различных видов и дополнительного сайта Asn150, специфического для LIF крыс. Третичная структура LIF мыши и ее функции более подробно описаны в публикациях Aikawa et al. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 1318-1325 и Senturk et al. (2005) *Immunology of Pregnancy*, editor Gil Mor., патенте США №5750654 и публикации D P Gearing (1987) *EMBO Journal* 1987-12-20, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Частичная последовательность LIF мыши зарегистрирована на веб-сайте SwissProt под номером доступа P09056.

Активность LIF мыши оценивают по его способности индуцировать дифференциацию клеток миелолейкоза M1. Специфическая активность составляет  $1 \times 10^6$  единиц/мл (номер по каталогу 03-0011 от Stemgent) и  $1 \times 10^7$  единиц/мл (номер по каталогу 03-

0011-100 от Stemgent), где 50 единиц определяется как количество мышиноного LIF, необходимого для индукции дифференциации у 50% колоний M1 в 1 мл среды. См. также публикации Williams, R.L. et al. (1988) Nature 336: 684-687.; Metcalf, D. et al. (1988) Leukemia 2: 216-221; Niwa, H. et al. (2009) Nature 460: 118-122; Xu, J. et al. (2010) Cell Biol Int. 34: 791-797; Fukunaga, N. et al. (2010) Cell Reprogram. 12: 369-376; и Metcalf D. (2003) Stem Cells 21: 5-14, к которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. «Эффективное количество LIF» означает концентрацию LIF, которая позволяет культуре крысиных ЭС клеток *in vitro* оставаться в недифференцированном плюрипотентном состоянии. Различные маркеры, которые могут быть использованы для анализа клеток, остающихся в плюрипотентном состоянии, описаны в других разделах данного документа.

Полипептид LIF, используемый в различных способах и композициях, представленных в данном документе, может быть получен от любого организма, включая млекопитающее, грызуна, человека, крысу или мышь. В одном варианте реализации изобретения полипептид LIF получен от мыши. В дополнительных вариантах реализации изобретения мышинный полипептид LIF имеет аминокислотную последовательность, приведенную под номером доступа SwissProt: P09056, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, а также приведена в SEQ ID NO: 1.

В других вариантах реализации изобретения можно использовать активный вариант или фрагмент мышиноного полипептида LIF, приведенного в SEQ ID NO: 1 или под номером доступа SwissProt: P09056. Такие активные варианты и фрагменты (включая активные варианты, имеющие по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1) более подробно описаны в других разделах данного документа.

Полипептид LIF, или его активный вариант, или фрагмент может быть предоставлен в культуру *in vitro* различными способами. В одном варианте реализации изобретения эффективное количество полипептида LIF, или его активного варианта, или фрагмента добавляют в культуральную среду. В других вариантах реализации изобретения питающие клетки генетически модифицируют для сверхэкспрессии полипептида LIF либо его активного варианта или фрагмента. Такие питающие клетки включают питающие клетки, полученные из фибробластов мышей линии DIA-M, подвергшихся гамма-облучению или обработке митомицином-C, которые экспрессируют связанный с матриксом LIF. Способ создания и использования таких генетически модифицированных питающих клеток можно найти, например, в публикациях Buehr et al. (2003) BiolReprod 68:222-229, Rathjen et al. (1990) Cell 62 1105-1115 и Buehr et al. (2008) Cell 135:1287-1298, которые включены в данный документ посредством ссылки. Гетерологичный LIF, экспрессируемый в питающих клетках, может быть из того же организма, что и питающие клетки, или из организма, отличного от того, из которого получена питающая клетка. Кроме того, гетерологичный LIF, экспрессируемый в питающих клетках, может быть из того же или из другого организма, что и ЭС клетки, которые поддерживает фидерный слой.

В других вариантах реализации изобретения питающие клетки, используемые в различных способах, описанных в настоящем документе, не являются генетически модифицированными для экспрессии гетерологичного полипептида LIF либо его активного варианта или фрагмента. Таким образом, в конкретных вариантах реализации изобретения монослой митотически инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов, используемый в способах настоящего изобретения, не был генетически модифицирован для экспрессии гетерологичного полипептида LIF.

В других вариантах реализации изобретения полипептид LIF либо его активный вариант или фрагмент добавляют в культуральную среду. Если LIF добавляют в культуральную среду, указанный LIF может быть получен от любого организма, включая млекопитающее, грызуна, человека, крысу или мышь. В одном варианте реализации изобретения LIF, находящийся в культуральной среде, получен от мыши. В дополнительных вариантах реализации изобретения мышинный полипептид LIF имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В других вариантах реализации изобретения может быть использован активный вариант или фрагмент мышинового полипептида LIF, приведенный в SEQ ID NO: 1. Такие активные варианты и фрагменты (включая активные варианты, имеющие по меньшей мере 75%, 80%, 85% 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1) более подробно описаны в других разделах настоящего документа.

В специфических вариантах реализации изобретения крысиные ЭС клетки и линии крысиных ЭС клеток, представленные в данном документе, сохраняют плюрипотентность *in vitro* без потребности в паракринной сигнализации LIF.

В специфических вариантах реализации изобретения LIF, или его активный вариант или фрагмент присутствует в культуральной среде в любой концентрации, которая сохраняет крысиные ЭС клетки. Полипептид LIF, или его активный вариант, или фрагмент присутствует в культуральной среде в концентрации от около 25 Ед/мл до около 50 Ед/мл, от около 50 Ед/мл до около 100 Ед/мл, от около 100 Ед/мл до около 125 Ед/мл, от около 125 Ед/мл до около 150 Ед/мл, от около 150 Ед/мл до около 175 Ед/мл, от около 175 Ед/мл до около 200 Ед/мл, от около 200 Ед/мл до около 225 Ед/мл, от около 225 Ед/мл до около 250 Ед/мл, от около 250 Ед/мл до около 300 Ед/мл, от около 300 Ед/мл до около 325 Ед/мл, от около 325 Ед/мл до около 350 Ед/мл, от около 350 Ед/мл до около 400 Ед/мл, от около 400 Ед/мл до около 425 Ед/мл, от около 425 Ед/мл до около 450 Ед/мл, от около 450 Ед/мл до около 475 Ед/мл, от около 475 Ед/мл до около 500 Ед/мл, от около 75 Ед/мл до около 500 Ед/мл или больше. В других вариантах реализации изобретения полипептид LIF, или его активный вариант, или фрагмент присутствует в культуральной среде в концентрации от около 25 Ед/мл до около 50 Ед/мл, от около 25 Ед/мл до около 100 Ед/мл, от около 75 Ед/мл до около 125 Ед/мл, от около 50 Ед/мл до около 150 Ед/мл, от около 90 Ед/мл до около 125 Ед/мл, от около 90 Ед/мл до около 110 Ед/мл, от около 80 Ед/мл до около 150 Ед/мл, от около 80 Ед/мл до около 125 Ед/мл. В специфическом варианте реализации изобретения полипептид LIF, или его активный вариант, или фрагмент присутствует в культуральной среде в концентрации около 100 Ед/мл.

Если используется мышинный LIF, мышинный полипептид LIF, или его активный вариант, или фрагмент присутствует в культуральной среде в любой концентрации, которая сохраняет крысиные ЭС клетки. Мышинный полипептид LIF, или его активный вариант, или фрагмент присутствует в концентрации от около 25 Ед/мл до около 50 Ед/мл, от около 50 Ед/мл до около 100 Ед/мл, от около 100 Ед/мл до около 125 Ед/мл, от около 125 Ед/мл до около 150 Ед/мл, от около 150 Ед/мл до около 175 Ед/мл, от около 175 Ед/мл до около 200 Ед/мл, от около 200 Ед/мл до около 225 Ед/мл, от около 225 Ед/мл до около 250 Ед/мл, от около 250 Ед/мл до около 300 Ед/мл, от около 300 Ед/мл до около 325 Ед/мл, от около 325 Ед/мл до около 350 Ед/мл, от около 350 Ед/мл до около 400 Ед/мл, от около 400 Ед/мл до около 425 Ед/мл, от около 425 Ед/мл до около 450 Ед/мл, от около 450 Ед/мл до около 475 Ед/мл, от около 475 Ед/мл до около 500 Ед/мл, от около 75 Ед/мл до около 500 Ед/мл или больше. В других вариантах реализации изобретения мышинный полипептид LIF, или его активный вариант, или

фрагмент присутствует в концентрации от около 25 Ед/мл до около 50 Ед/мл, от около 25 Ед/мл до около 100 Ед/мл, от около 75 Ед/мл до около 125 Ед/мл, от около 50 Ед/мл до около 150 Ед/мл, от около 90 Ед/мл до около 125 Ед/мл, от около 90 Ед/мл до около 110 Ед/мл, от около 80 Ед/мл до около 150 Ед/мл, от около 80 Ед/мл до около 125 Ед/мл. В специфическом варианте реализации изобретения мышинный полипептид LIF, или его активный вариант, или фрагмент присутствует в культуральной среде в концентрации около 100 Ед/мл.

Используемая культуральная среда поддерживает крысиные ЭС клетки. Таким образом, в специфических вариантах реализации изобретения культуральная среда, используемая в различных способах и композициях, будет поддерживать плюрипотентность всех или большинства (т.е. более 50%) крысиных ЭС клеток в клеточной линии в течение периода, равного по меньшей мере 5, 10 или 15 пересевам. В одном варианте реализации изобретения культуральная среда содержит одно или больше соединений, помогающих в поддержании плюрипотентности. В одном варианте реализации изобретения культуральная среда содержит ингибитор пути MEK и ингибитор гликогенсинтазы-киназы-3 (GSK-3). Среда может дополнительно содержать дополнительные компоненты с целью поддержания ЭС клеток, включая, например, ингибиторы рецептора FGF, ингибиторы ROCK и/или ингибиторы ALK (рецептор TGF $\beta$ ). Неограничивающий пример ингибиторов рецептора FGF включает PD184352. Неограничивающий пример ингибитора ROCK включает Y-27632, а неограничивающий пример ингибитора ALK (рецептор TGF $\beta$ ) включает A-83-01. В специфических вариантах реализации изобретения при оттаивании криоконсервированных кЭСК или при пересеве кЭСК после диссоциации трипсином используется среда 2i (Таблица 2) с 10 мкМ ROCKi.

В других вариантах реализации изобретения среда содержит комбинацию ингибиторов, состоящую из ингибитора пути MEK и ингибитора гликогенсинтазы-киназы-3 (GSK-3).

В одном неограничивающем варианте реализации изобретения культуральная среда содержит ингибитор GSK-3, представляющий собой CHIR99021, и/или содержит ингибитор MEK, представляющий собой PD0325901. В других вариантах реализации изобретения среда содержит комбинацию ингибиторов, состоящую из CHIR99021 и PD0325901. Любое из этих соединений может быть получено, например, от компании Stemgent. В специфических вариантах реализации изобретения CHIR99021 присутствует в культуральной среде в концентрации от около 0,5 мкМ до около 3 мкМ, от около 0,5 мкМ до около 3,5 мкМ, от около 0,5 мкМ до около 4 мкМ, от около 0,5 мкМ до около 1 мкМ, от около 1 мкМ до около 1,5 мкМ, от около 1,5 мкМ до около 2 мкМ, от около 2 мкМ до около 2,5 мкМ, от около 2,5 до около 3 мкМ, от 3 мкМ до около 3,5 мкМ. В дополнительных вариантах реализации изобретения CHIR99021 присутствует в культуральной среде в концентрации около 3 мкМ. В других вариантах реализации изобретения PD0325901 присутствует в культуральной среде в концентрации от около 0,4 мкМ до около 1 мкМ, от около 0,4 мкМ до около 1,5 мкМ, от около 0,4 мкМ до около 2 мкМ, от около 0,4 мкМ до около 0,8 мкМ, от 0,8 мкМ до около 1,2 мкМ, от около 1,2 до около 1,5 мкМ. В дополнительных вариантах реализации изобретения PD0325901 присутствует в культуральной среде в концентрации около 1 мкМ. В специфических вариантах реализации изобретения CHIR99021 присутствует в культуральной среде в концентрации около 3 мкМ, а PD0325901 присутствует в концентрации около 1 мкМ.

В одном неограничивающем варианте реализации изобретения культуральная среда, используемая в различных способах и композициях, описанных в данном документе,

представлена в Таблице 2. В контексте данной заявки среда, описанная в Таблице 2, называется средой 2i.

Таблица 2: Неограничивающие культуральные среды для ЭС крысы.

Реагент	Концентрация
DMEM/F12 базовая среда	1 x (50%)
среда Neurobasal	1 x (50%)
Пенициллин/стрептомицин	1%
L-глутамин	4 мМ
2-меркаптоэтанол	0,1 мМ
добавка N2	1 x
добавка B27	1 x
LIF	100 Ед/мл
PD0325901 (ингибитор MEK).	1 мкМ
CHIR99021 (ингибитор GSK).	3 мкМ

Дополнительные среды, которые могут быть использованы, включают описанные в публикациях Li et al. (2008) *Cell* 135:1299-1310, Yamamoto et al. (2012) *Transgenic Rats* 21:743-755, Ueda et al. (2008) *PLoS ONE* 3(6):e2800, Meek et al. (2010) *PLoS ONE* 4 (12): e14225; Tong et al. (2010) *Nature* 467:211-213; публикации патента США 2012/0142092, Buehr et al. (2008) *Cell* 135:1287-1298, Li et al. (135) *Cell* 1299-1310, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. При использовании таких сред концентрация и источник LIF могут быть изменены, как описано в данном документе. В специфических вариантах реализации изобретения различные культуральные среды используют в комбинации с мышинным LIF либо его активным вариантом или фрагментом, и в дополнительных вариантах реализации изобретения различные культуральные среды содержат мышинный LIF либо его активный вариант или фрагмент в концентрации от около 50 Ед/мл до около 100 Ед/мл, от около 50 Ед/мл до около 150 Ед/мл или около 100 Ед/мл.

Температуру культур крысиных ЭС клеток, как для производства ЭС клеточной линии, так и для культивирования и поддержания линии ЭС, обычно поддерживают на уровне от около 35°C до около 37,5°C. В специфическом варианте реализации изобретения температура составляет 37,0°C. Культивирование обычно осуществляют с использованием 7,5% CO<sub>2</sub>.

#### ii. Создание линии крысиных ЭС клеток

Предлагаются способы создания крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток. Такие способы включают (а) культивирование *in vitro* первого фидерного клеточного слоя и эмбриона на стадии морулы, эмбриона на стадии бластоцисты или эмбриона крысы на стадии развития между эмбрионом на стадии морулы и эмбрионом на стадии бластоцисты, где у эмбриона крысы была удалена блестящая оболочка яйцеклетки и

где условия культивирования сохраняют плюрипотентность крысиной ЭС клетки и содержат среду с мышинным фактором ингибирования лейкемии (LIF) либо его активным вариантом или фрагментом; и (b) перенос разрастания аморфной недифференцированной массы крысиных ЭС клеток в лунку для культивирования *in vitro*, содержащую второй фидерный клеточный слой, и культивирование разрастания в условиях, которые сохраняют плюрипотентность крысиных ЭС клеток, и содержат среды с мышинным LIF либо его активным вариантом или фрагментом, тем самым создавая линию крысиных ЭС клеток. Различные способы дополнительно включают пересев и культивирование *in vitro* клеток линии крысиных ЭС клеток, причем каждое последующее культивирование *in vitro* включает культивирование крысиных ЭС клеток на фидерном клеточном слое в условиях, которые сохраняют плюрипотентность крысиных ЭС клеток и содержат среду с мышинным LIF либо его активным вариантом или фрагментом. Также предлагаются линии крысиных ЭС клеток, полученных такими способами.

Неограничивающие примеры способов создания линии крысиных ЭС клеток, имеющей различные характеристики, которые рассматриваются в данном документе, представлены в Примере 3. Вкратце, эмбрион крысы (т.е. эмбрион на стадии морулы, эмбрион на стадии бластоцисты или эмбрион крысы на стадии развития между эмбрионом на стадии морулы и эмбрионом на стадии бластоцисты) вымывают из маток самок крыс. В специфических вариантах реализации изобретения получают бластоцисту или 8-клеточный эмбрион. Блестящую оболочку яйцеклетки удаляют и эмбрионы крыс культивируют на питающих клетках (как описано в других разделах данного документа), которые в специфических вариантах реализации изобретения содержат монослой митотически инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ). Клетки эмбриона на стадии морулы, эмбриона на стадии бластоцисты или эмбриона крысы на стадии развития между эмбрионом на стадии морулы и эмбрионом на стадии бластоцисты культивируют *in vitro* в условиях, которые сохраняют крысиные ЭС клетки и, таким образом, являются достаточными для сохранения плюрипотентности и/или тотипотентности ЭС клеток. На этой стадии можно использовать различные среды, в том числе любую из различных сред, рассмотренных выше, которые содержат в средах LIF, в том числе мышинный LIF либо его активный вариант или фрагмент.

Культуры наблюдают на наличие разрастания (аморфная недифференцированная масса клеток). После того как разрастание достигает соответствующего размера, данное разрастание переносят на новый фидерный планшет и культивируют. Для получения множества колоний перенос сопровождается ферментативной диссоциацией с использованием трипсина. Этот перенос обычно называют «пересев 1». Скорость, с которой растет каждая линия, различна. Среда меняют по мере необходимости, чтобы поддерживать плюрипотентность или тотипотентность крысиных ЭС клеток. Культуры наблюдают на наличие колоний, имеющих морфологию эмбриональных стволовых клеток. Такая морфология включает одну или больше следующих характеристик: (a) круглые, циркулярные бугорки, возвышающиеся над монослоем питающих клеток; (b) клетки, плотно упакованные вместе, так что клеточные границы трудно увидеть; (c) более маленький размер клеток; (d) небольшое количество цитоплазмы и увеличенное ядро, (e) образуют сфероподобные колонии при посеве на питающие клетки *in vitro*. После того, как появляются такие колонии, культивирование может продолжаться до достижения примерно 50% слияния. Колонии затем переносят на новый фидерный планшет. Для увеличения числа колоний перенос сопровождается ферментативной диссоциацией с использованием трипсина. Этот процесс называют «пересев 2». Клетки продолжают культивировать с питающими клетками до достижения около 50% слияния,

после чего эти клетки могут подвергаться дополнительным пересевам для поддержания клеточных линий или эти линии могут быть заморожены. См. также публикации Tong et al. (2010) Nature 467 (9):211-215; Li et al. (2008) Cell 135:1299-1310 и Buehr et al. (2008) Cell 135:1287-1298, которые включены в данный документ посредством ссылки. Таким образом, в специфических вариантах реализации изобретения возможна субкультивация и поддержание недифференцированного состояния различных крысиных ЭС клеток, линий клеток и популяций клеток, описанных в данном документе.

В одном неограничивающем варианте реализации изобретения деривация крысиных ЭС клеток происходит следующим образом. В день 0 самок крыс умерщвляют и отсекают маточные трубы и рога матки и помещают в чашку с культурой ткани, содержащую теплую среду N2B27. Средой промывают рога матки и маточные трубы, чтобы извлечь бластоцисты в среду. Бластоцисты собирают и переносят на чашку для культивирования эмбриона, содержащую KSOM+2i (1мкМРD0325901, 3мкМ СHIR99021). KSOM можно приобрести в компании Millipore, номер по каталогу MR-106-D. Среда 2i, упоминавшаяся в данном документе, содержит набор сред, приведенный в Таблице 2. Клетки культивируют в течение ночи при 37°C и 7,5% CO<sub>2</sub>.

В других неограничивающих вариантах реализации изобретения крысиные ЭС клетки получают от 8-клеточных эмбрионов или замороженных 8-клеточных эмбрионов. Эмбрионы культивируют в среде M2 в течение 10 минут при комнатной температуре, а потом переносят на среду KSOM+2i и культивируют в течение ночи.

В неограничивающем примере деривация крысиных ЭС клеток происходит следующим образом: на День 1 - перенос эмбрионов с наличием полости в среду 2i (Таблица 2) и культивирование в течение ночи. Культивирование эмбрионов без сформированной полости продолжают в среде KSOM+2i. На день 2 все оставшиеся эмбрионы переносят в среду 2i, независимо от того, произошло ли образование в них полости. Культивирование продолжают в течение ночи в среде 2i. На день 3 эмбрионы инкубируют с кислотой Тироде для удаления блестящей оболочки яйцеклетки и промывают 3 раза в среде 2i для удаления кислоты Тироде. Каждый эмбрион депонируют в отдельной лунке питающего планшета, в котором каждая лунка содержит монослой митотически инактивированных мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ). Клетки культивируют в течение ночи в среде 2i. На день 4 и 5 посеянные клетки эмбрионов наблюдают на наличие разрастания, аморфной недифференцированной массы клеток. Разрастания готовы для переноса, когда их размер увеличивается в два раза по сравнению с размером высеянного эмбриона. Каждый день истощенную среду удаляют и заменяют свежей средой 2i. Разрастания переносят в новые питающие лунки, и снова удаляют истощенную среду, и питающие лунки промывают фосфатно-солевым буферным раствором, ФСБ. Удаляют ФСБ, добавляют трипсин и инкубируют около 10 минут. Реакцию с трипсином останавливают добавлением 30 мкл среды 2i и 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Клетки осторожно диссоциируют и все содержимое переносят в лунку питающего планшета. Этот процесс называют «Пересев 1» 1 (P1). Клетки культивируют в течение ночи в среде 2i. С дня 5-8, в зависимости от того, как быстро растет каждая линия, среду 2i меняют каждый день и культуры наблюдают на наличие колоний, имеющих морфологию ЭСК. Такая морфология ЭСК подробно описана в других разделах данного документа. Культивирование продолжается до тех пор, пока колонии не разрастутся до около 50% слияния. Затем колонии обрабатывают трипсином и пересевуют, как и раньше, в питающие лунки. Этот процесс называют «пересев 2». Питание и наблюдение за каждой линией продолжается до тех пор, пока не произойдет около 50% слияния. Клетки, как обычно, обрабатывают трипсином.

Реакцию с трипсином останавливают добавлением среды 2i+10% ФБС. Клетки осаждают центрифугированием, и клетки помещают в 400 мкл среды для замораживания (70% 2i, 20% ФБС, 10% ДМСО). После этого клетки можно заморозить. Этот процесс называют «пересев 3».

5 iii. Поддержание и пересев линии крысиных ЭС клеток

Дополнительно предложены способы поддержания или культивирования клеточной линии эмбриональных стволовых клеток крысы. Этот способ включает культивирование *in vitro* фидерного клеточного слоя и линии крысиных ЭС клеток, причем условия культивирования сохраняют плюрипотентность крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток и содержат среду с мышинным фактором ингибирования лейкемии (LIF) либо его активным вариантом или фрагментом. В таких способах используют культуральную среду и фидерный клеточный слой, как описано выше. В одном варианте реализации изобретения линию крысиных ЭС клеток можно пересеивать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 или больше раз. В вариантах реализации изобретения крысиные ЭС клетки можно пересеивать до по меньшей мере 11 раз в среде, содержащей ингибитор GSK3 и ингибитор MEK, без снижения ее целевой эффективности или эффективности трансмиссии через зародышевую линию целевой генетической модификации.

Линии крысиных ЭС клеток питают и наблюдают. В специфических вариантах реализации изобретения пересев осуществляют при слиянии культуры, составляющем около 30%, 40%, 50% или 60%. В других вариантах реализации изобретения пересев осуществляют при слиянии культуры на 50%. В зависимости оттого, как быстро растет каждая линия, пересев можно осуществлять каждые 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 95 или 100 часов. В других вариантах реализации изобретения время между посевами находится в диапазоне от 24 часов до 96 часов, от около 30 до 50 часов, от около 25 до 75 часов, от около 50 до 96 часов, от около 25 до 75 часов, от около 35 до 85 часов или от около 40 до 70 часов. В одном варианте реализации изобретения время удвоения крысиной ЭС клетки, линии клеток или популяции клеток, описанной в настоящем документе, находится в диапазоне от около 24 часов до около 36 часов. В одном варианте реализации изобретения время удвоения крысиной ЭС клетки составляет 25 часов.

Различные линии крысиных ЭС клеток при получении и поддержании, описанном в данном документе, могут иметь одно или более следующих свойств:

(a) обладают компетентностью зародышевой линии, что означает, что при имплантации крысиной ЭС клетки в крысиный эмбрион-хозяин геном линии крысиных ЭС клеток передается потомству;

(b) обладают компетентностью зародышевой линии после целевой генетической модификации, что означает, что при имплантации крысиной ЭС клетки в крысиный эмбрион-хозяин целевая генетическая модификация в геноме линии крысиных ЭС клеток передается потомству;

(c) обладают плюрипотентностью *in vitro*;

(d) обладают тотипотентностью *in vitro*;

(e) при культивации *in vitro* свободно прикрепляются к фидерному клеточному слою;

(f) при культивации *in vitro* образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*;

(g) сохраняют плюрипотентность при культивации *in vitro* в условиях, включающих фидерный клеточный слой, который не является генетически модифицированным для экспрессии фактора ингибирования лейкемии (LIF), причем культуральная среда

содержит достаточную концентрацию LIF;

(h) сохраняют плюрипотентность при культивации *in vitro* в условиях, включающих фидерный клеточный слой, причем культуральная среда содержит мышинный LIF либо его активный вариант или фрагмент;

5 (i) имеют молекулярную сигнатуру, которая характеризуется следующим:

i) экспрессией одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, включая белок, связанный с адгезионными контактами (A<sub>jp</sub>1), клаудин 5 (Cldn5), фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимую протеинкиназу IV (Camk4), эфрин-A1 (Efnal), EPH рецептор A4 (Epha4), белок бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белок 1, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp11), интерлейкин 36 бета (Ilf8), рецептор альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактор 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептор 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейрональный рецептор пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазу нерецепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокс 2 каудального типа (Cdx2), повторные домены 1 фибронектина III и анкирина (Fankl), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxel), ген, родственный hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxel), ген, родственный hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер (Lef1), 10 ген 3, подобный Sal (дрозофила) (Sall3), гомеобокс 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинацию;

ii) экспрессией по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, включая белок, связанный с адгезионными контактами (A<sub>jp</sub>1), клаудин 5 (Cldn5), фактор 9 25 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимую протеинкиназу IV (Camk4), эфрин-A1 (Efnal), EPH рецептор A4 (Epha4), белок бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белок 1, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp11), интерлейкин 36 бета (Ilf8), рецептор альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактор 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептор 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейрональный рецептор пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазу нерецепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокс 2 каудального типа (Cdx2), повторные домены 1 фибронектина III и анкирина (Fankl), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxel), ген, родственный hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxel), ген, родственный hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер (Lef1), 30 ген 3, подобный Sal (дрозофила) (Sall3), гомеобокс 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинацию;

iii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 14, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

iv) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 14, по сравнению с ЭС 45 клеткой мышей линии F1H4;

v) экспрессией одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13;

vi) экспрессией по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,

20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13;

vii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

viii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

ix) по меньшей мере 20-кратным снижением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 12, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4; и/или

x) по меньшей мере 20-кратным снижением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 12, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

xi) любой комбинацией экспрессии генов, специфических для крысиных ЭС клеток согласно разделам (i)-(x);

xii) уровнем относительной экспрессии маркеров плюрипотентности, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 перечисленных маркеров плюрипотентности. См. уровни относительной экспрессии в колонке ранжирования плюрипотентности Таблицы 15;

xiii) уровнем относительной экспрессии мезодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3 или 4 перечисленных мезодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке мезодермального ранжирования Таблицы 15;

xiv) уровнем относительной экспрессии эндодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 перечисленных эндодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке эндодермального ранжирования таблицы 15;

xv) уровнем относительной экспрессии нейронных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2 и 3 перечисленных нейронных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке нейронного ранжирования Таблицы 15;

xvi) уровнем относительной экспрессии трофэктодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для перечисленных трофэктодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке трофэктодермального ранжирования Таблицы 15;

xvii) любым уровнем относительной экспрессии одного или более (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) маркеров плюрипотентности, мезодермальных маркеров, эндодермальных маркеров, нейронных маркеров и/или трофэктодермальных маркеров, приведенных в Таблице 15;

xviii) уровнем относительной экспрессии каждого из маркеров, приведенных в Таблице 15;

xix) любой комбинацией сигнатур, приведенных в разделах xii-xiix; и/или

xx) любой комбинацией сигнатур, приведенных в разделах i-xiix;

(j) обладают способностью продуцировать крысу F0;

(k) способны к субкультивированию и поддержанию недифференцированного состояния;

(l) имеют то же количество хромосом, что и клетка нормальной крысы; и/или  
(m) сохраняют плюрипотентность *in vitro* без потребности в паракринной сигнализации LIF;

(n) обладают способностью самообновления, что означает, что они делятся  
5 бесконечно, сохраняя плюрипотентность.

Такие свойства данной линии крысиных ЭС клеток могут присутствовать в любом из пересевов, в том числе в пересевах 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 или позже.

Таким образом, в одном неограничивающем варианте реализации изобретения  
10 предлагается культура *in vitro*, содержащая фидерный клеточный слой и популяцию крысиных ЭС клеток, причем условия культивирования *in vitro* сохраняют плюрипотентность крысиных ЭС клеток и содержат среду с мышинным фактором ингибирования лейкемии (LIF) либо его активным вариантом или фрагментом. В специфических вариантах реализации изобретения в крысиных ЭС клетках,  
15 культивируемых в таких условиях, плюрипотентность сохраняется по меньшей мере у 50% популяции клеток на протяжении по меньшей мере 10 пересевов, плюрипотентность сохраняется по меньшей мере у 60% популяции клеток на протяжении по меньшей мере 10 пересевов, плюрипотентность сохраняется по меньшей мере у 70% популяции клеток на протяжении по меньшей мере 10 пересевов, плюрипотентность сохраняется по  
20 меньшей мере у 75% популяции клеток на протяжении по меньшей мере 10 пересевов, плюрипотентность сохраняется по меньшей мере у 80% популяции клеток на протяжении по меньшей мере 10 пересевов, плюрипотентность сохраняется по меньшей мере у 85% популяции клеток на протяжении по меньшей мере 10 пересевов, плюрипотентность сохраняется по меньшей мере у 90% популяции клеток на протяжении по меньшей мере  
25 10 пересевов или плюрипотентность сохраняется по меньшей мере у 95% популяции клеток на протяжении по меньшей мере 10 пересевов.

Дополнительно в настоящем документе предлагаются культуры *in vitro*, содержащие различные крысиные ЭС клетки, популяции клеток и линии клеток, описанные в данном документе, а также наборы для культивирования этих различных ЭС клеток. Например,  
30 как описано выше, в специфических вариантах реализации изобретения различные крысиные ЭС клетки, представленные в данном документе, имеют одну или больше следующих характеристик: (1) при культивации *in vitro* свободно прикрепляются к фидерному клеточному слою; (2) при культивации *in vitro* они образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*; (3) они поддерживают  
35 плюрипотентность при культивации *in vitro* в условиях, включающих фидерный клеточный слой, который не является генетически модифицированным для экспрессии фактора ингибирования лейкемии (LIF), причем культуральная среда содержит достаточную концентрацию LIF; и/или (4) они способны к субкультивированию и поддержанию недифференцированного состояния. Более того, популяции крысиных  
40 ЭС клеток в любой из этих *in vitro* культур могут содержать, например, популяцию клеток, в которой по меньшей мере 70%, 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% клеток в популяции являются эуплоидными, диплоидными и/или имеют 42 хромосомы.

Один способ культивирования крысиных эмбриональных стволовых клеток *in vitro*  
45 включает (a) предоставление культуры *in vitro*, содержащей фидерный клеточный слой, в популяцию выделенных крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток; и (b) культивирование *in vitro* в условиях, достаточных для поддержания плюрипотентности и/или тотипотентности выделенной крысиной эмбриональной стволовой (ЭС) клетки,

причем крысиные ЭС клетки образуют колонии, свободно прикрепляющиеся к фидерному клеточному слою. «Свободное прикрепление» или «прикрепляются свободно» означает, что если чашку с культурой оставить в покое на какое-то время (минимум 8 часов), некоторые колонии будут прикрепляться к фидерному слою таким образом, что они могут сохранять прикрепление при осторожном перемещении чашки для культивирования. В более мелких лунках (в которых среда перемещается меньше) свободное прикрепление происходит чаще. В любом случае, эти колонии могут быть смещены либо путем а) создания завихрения в чаше для культивирования, либо посредством осторожного отбора пипеткой среды по всей поверхности фидерного слоя. Морфология этих свободно прикрепленных колоний по-прежнему остается сферической. В таких случаях крысиные ЭС клетки образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*. Такие сфероподобные колонии показаны, например, на Фигуре 1.

#### iv. Наборы и культуры *in vitro*

Крысиные ЭС клетки и линии крысиных ЭС клеток, предложенных в настоящем документе, могут содержаться в наборе или в изделии. В специфических вариантах реализации изобретения набор или изделие содержит любую из линий или популяций крысиных ЭС клеток, описанных в данном документе. Набор может дополнительно содержать любую культуральную среду, поддерживающую крысиную ЭС клетку, включая среду, поддерживающую плюрипотентность крысиных ЭС клеток. Такая среда может представлять собой культуральную среду, содержащую мышиный LIF либо его активный вариант или фрагмент, как более подробно описано в других разделах данного документа. Среда в наборе может дополнительно содержать ингибитор MEK и ингибитор GSK-3, или, в альтернативном варианте, среда в наборе может дополнительно содержать комбинацию ингибиторов, состоящую из ингибитора MEK и ингибитора GSK-3. В специфических вариантах реализации изобретения среда в наборе содержит ингибитор MEK, представляющий собой PD0325901, и/или ингибитор GSK-3, представляющий собой CHIR99021. Любая из различных сред, описанных в данном документе, может содержаться в наборе.

Дополнительно предложены набор или изделие, содержащее любую из линий или популяций крысиных ЭС клеток, описанных в данном документе, любую из различных сред, описанных в данном документе, и популяцию питающих клеток. В одном варианте реализации изобретения питающие клетки в наборе или изделии не являются генетически модифицированными для экспрессии LIF и/или питающие клетки содержат митотически инактивированные мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ). Любые питающие клетки, описанные в данном документе, могут использоваться в наборе или в изделии.

#### IV. Генетическая модификация крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток

Различные крысиные ЭС клетки и клеточные линии, описанные в данном документе, могут быть модифицированы и могут содержать по меньшей мере одну целевую генетическую модификацию. Таким образом, предлагаются различные способы генетической модификации выделенных крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клеток, описанных в данном документе. Способ включает введение в геном выделенной крысиной ЭС клетки, описанной в данном документе, целевой генетической модификации для получения генетически модифицированной крысиной ЭС клетки. Целевая генетическая модификация может представлять собой любую модификацию в геноме крысиной ЭС, включая, например, инсерцию, делецию, нокаут, нокин, мутацию или их комбинацию. В одном варианте реализации изобретения целевая генетическая модификация представляет собой инсерцию гетерологичного полинуклеотида в геном

крысиной ЭС клетки. В данном документе термин «гетерологичный» со ссылкой на последовательность означает последовательность, которая происходит из чужеродных видов, или, если она происходит из того же вида, является существенно модифицированной по сравнению с нативной формой в композиции и/или геномном локусе посредством преднамеренного вмешательства человека.

В одном аспекте предлагается выделенная крысиная ЭС клетка или линия крысиных ЭС клеток, которая способна поддерживать плюрипотентность после одной или большего количества генетических модификаций *in vitro* и которая способна передавать генетически модифицированный геном зародышевой линии поколению F1. Таким образом, крысиная ЭС клетка сохраняет свою плюрипотентность, чтобы развиваться во множество типов клеток после одной или больше серийных генетических модификаций *in vitro* (например, двух, трех, четырех, пяти, шести или больше серийных генетических модификаций). В других вариантах реализации изобретения выполняют множество целевых генетических модификаций в данной крысиной ЭС клетке, включая, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 14, 15 или больше. Таким образом, в геном также можно интегрировать множество гетерологичных полинуклеотидов, включая, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 14, 15 или больше.

В одном варианте реализации изобретения после любой из от одной до 15 серийных генетических модификаций генетически модифицированные крысиные ЭС клетки при воздействии среды для дифференциации способны дифференцироваться во множество типов клеток. В одном варианте реализации изобретения после любой из от одной до 15 серийных генетических модификаций генетически модифицированные крысиные ЭС клетки способны сохраняться в культуре в недифференцированном состоянии. В одном варианте реализации изобретения генетически модифицированные и культивированные крысиные ЭС клетки в недифференцированном состоянии, при использовании в качестве донорских клеток в крысином эмбрионе-хозяине, заселяют эмбрион и образуют бластоцисту, содержащую от одной до пятнадцати генетических модификаций. В одном варианте реализации изобретения при имплантации бластоцисты суррогатной матери в условиях, подходящих для развития беременности, она развивается в потомство F0 крыс, которое содержит от одной до 15 генетических модификаций.

Можно использовать различные способы создания целевых генетических модификаций в геноме крысиной ЭС клетки. Например, в одном случае для целевой генетической модификации используется система, которая будет создавать целевую генетическую модификацию посредством события гомологичной рекомбинации. В других случаях крысиные ЭС клетки могут быть модифицированы с использованием нуклеазных агентов, которые создают разрыв одиночной или двойной цепи в целевом участке генома. Одно- или двухцепочечный разрыв затем восстанавливается по пути негомологичного соединения концов (NHEJ). Такие системы находят применение, например, в создании целевой потери функциональных генетических модификаций. См., например, публикацию Tesson et al. (2011) *Nature Biotechnology* 29:695-696, включенную в данный документ посредством ссылки. Такие агенты включают эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) (WO 2010/079430; Morbitzer et al. (2010) *PNAS* 10.1073/pnas. 1013133107; Scholze & Boch (2010) *Virulence* 1:428-432; Christian et al. *Genetics* (2010) 186:757-761; Li et al. (2010) *Nuc. Acids Res.* (2010) doi:10.1093/nar/gkq704; и Miller et al. (2011) *Nature Biotechnology* 29:143-148; заявки на патент №№2011/0239315 A1, 2011/0269234 A1, 2011/0145940 A1, 2003/0232410 A1, 2005/0208489 A1, 2005/0026157 A1, 2005/0064474 A1, 2006/0188987 A1 и 2006/0063231 A1 (включены в данный документ посредством ссылки); нуклеазу белкового домена

«цинковые пальцы» (ZFN) (US20060246567; US20080182332; US20020081614; US20030021776; WO/2002/057308A2; US20130123484; US20100291048; и WO/2011/017293A2, которые включены в данный документ посредством ссылки); мегануклеазу (см., Epinat et al., (2003) *Nucleic Acids Res* 31:2952-62; Chevalier et al., (2002) *Mol Cell* 10:895-905; Gimble et al., (2003) *Mol Biol* 334:993-1008; Seligman et al., (2002) *Nucleic Acids Res* 30:3870-9; Sussman et al., (2004) *J Mol Biol* 342:31-41; Rosen et al., (2006) *Nucleic Acids Res* 34:4791-800; Chames et al., (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e178; Smith et al., (2006) *Nucleic Acids Res* 34:e149; Gruen et al., (2002) *Nucleic Acids Res* 30:e29; Chen and Zhao, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e154; WO2005105989; WO2003078619; WO2006097854; WO2006097853; WO2006097784; и WO2004031346); и систему CAS/CRISPER (Mali P et al. (2013) *Science* 2013 Feb 15;339(6121):823-6; Jinek M et al. *Science* 2012 Aug 17;337(6096):816-21; Hwang WY et al. *Nat Biotechnol* 2013 Mar; 31(3):227-9; Jiang W et al. *Nat Biotechnol* 2013 Mar; 31(3):233-9; и Cong L et al. *Science* 2013 Feb 15; 339(6121):819-23, которые включены в данный документ посредством ссылки).

В других вариантах реализации настоящего изобретения целевую геномную модификацию можно выполнить с использованием нацеленного вектора гомологичной рекомбинации. В таких случаях нацеленный вектор содержит вставку полинуклеотида и дополнительно содержит расположенные выше и ниже группы гомологии, которые фланкируют вставку полинуклеотида. Группы гомологии, которые фланкируют вставку полинуклеотида, соответствуют областям генома в целевом геномном локусе. Для удобства, соответствующие геномные области в пределах целевого геномного локуса называют в данном описании «сайтами-мишенями». Таким образом, в одном примере, нацеленный вектор может содержать первую вставку полинуклеотида, которую фланкируют первая и вторая группы гомологии, соответствующие первому и второму сайтам-мишеням, расположенным в целевом геномном локусе. Нацеленный вектор, таким образом, помогает в интеграции вставки полинуклеотида в целевой геномный локус посредством события гомологичной рекомбинации, которое происходит между группами гомологии и соответствующими сайтами-мишенями в геноме клетки.

В данном документе термины группа гомологии и сайт-мишень «соответствуют» друг другу или являются «соответствующими», когда две области разделяют достаточный уровень идентичности последовательности друг с другом, чтобы действовать в качестве субстратов для реакции гомологичной рекомбинации. Термин «гомологии» означает ДНК-последовательности, которые являются идентичными или разделяют идентичность последовательности с соответствующей последовательностью. Идентичность последовательности между данным сайтом-мишенью и соответствующей группой гомологии, имеющихся на нацеленном векторе, может представлять собой любую степень идентичности последовательностей, которая позволяет произойти гомологичной рекомбинации. Например, величина идентичности последовательности, разделяемой группой гомологии нацеленного вектора (или его фрагмента) и сайтом-мишенью (или его фрагментом), может составлять 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%, 99,5%, 99,9% или 100% идентичности последовательности, таким образом, что последовательности подвергаются гомологичной рекомбинации. Более того, соответствующая область гомологии между группой гомологии и соответствующим сайтом-мишенью может быть любой длины, достаточной для содействия гомологичной рекомбинации в отщепленном сайте распознавания.

В специфических вариантах реализации изобретения выделенная крысиная ЭС клетка, линия клеток или популяция клеток демонстрируют эффективность гомологичной

рекомбинации, составляющую по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по  
 5 меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%. В одном варианте реализации изобретения эффективность гомологичной рекомбинации при использовании крысиной ЭС клетки  
 10 составляет больше 4%.

В специфических вариантах реализации изобретения при создании целевой генетической модификации в крысиной ЭС клетке используют селективный маркер. Полинуклеотид, кодирующий селективный маркер, может присутствовать в нацеленном векторе, предназначенном для введения целевой генетической модификации в геном,  
 15 либо он может быть на отдельной плазмиде или векторе. Полинуклеотид, кодирующий селективный маркер, может содержаться в кассете экспрессии. Различные компоненты такой кассеты экспрессии более подробно описаны в других разделах данного документа.

Различные селективные маркеры могут быть использованы в способах и композициях,  
 20 описанных в настоящем документе. Такие селективные маркеры могут, например, придавать устойчивость к антибиотику, такому как G418, гигромицину, бластоцидину, пурамицину или неомицину. Такие селективные маркеры включают неомицинофосфотрансферазу (neo<sup>r</sup>), гигромицин-В фосфотрансферазу (hyg<sup>r</sup>), пурамицин  
 25 N-ацетилтрансферазу и бластицидин S дезаминазу (bsr<sup>r</sup>). В других вариантах реализации изобретения селективный маркер функционально связан с индуцибельным промотором и экспрессия селективного маркера токсична для клетки. Неограничивающие примеры таких селективных маркеров включают ксантин/гуанин фосфорибозилтрансферазу (gpt), гагипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу (HGPRT) или тимидинкиназу  
 30 вируса простого герпеса (HSV-TK). См., например, публикации Santerre et al. (1984) Gene 30:147-56; Joyner (1999) The Practical Approach Series, 293; Santerre et al. (1984) Gene 30:147-56; Bernard et al. (1985) Exp Cell Res 158:237-43; Giordano and McAllister (1990) Gene, 88: 285-8; Izumi et al. (1991) Sep Cell Res 197:229-33), которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В специфических вариантах реализации  
 35 изобретения селективный маркер neoR представляет собой ген неомицинофосфотрансферазы (neo), описанный в публикации Beck et al. (1982) Gene, 19: 327-36, которая включена в данный документ посредством ссылки. Селективный маркер neoR представляет собой тот, что использовался в патентах США №7205148 или 6596541, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В специфических вариантах реализации изобретения используемый селективный маркер представляет собой неослабленный селективный маркер. «Неослабленный селективный маркер» представляет собой селективный маркер, который сохраняет активность нативного полипептида, или селективный маркер имеет повышенную  
 40 активность по сравнению с нативной формой полипептида. Повышенная активность селективного маркера может представлять собой любое статистически значимое повышение активности, включая, например, повышение по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 80% или выше. Таким образом, экспрессия неослабленного селективного маркера в клетке-хозяине обеспечит более высокий процент клеток-хозяев, выживающих в присутствии более высокой концентрации селективного агента, чем

при использовании ослабленного селективного маркера. Неослабленные селективные маркеры включают, например, неомициновый неослабленный селективный маркер. См., например, публикацию Beck et al. (1982) Gene, 19:327-36 либо патент США №7205148 или 6596541, которые включены в данный документ посредством ссылки.

5 В других случаях повышенная активность селективного маркера по сравнению с ослабленным селективным маркером и/или селективным маркером дикого типа (нативным) может быть результатом увеличения количества копий какого-либо из неослабленного, ослабленного или интактного селективного маркера в геноме крысиной ЭС клетки. Таким образом, данная крысиная ЭС клетка может содержать в своем  
10 геноме по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше копий данного селективного маркера (т.е. неослабленного селективного маркера, ослабленного селективного маркера или нативного (дикого типа) селективного маркера).

Различные используемые селективные маркеры кодируются полинуклеотидом, функционально связанным с промотором, активным в крысиной ЭС клетке. В  
15 специфических вариантах реализации изобретения повышенная активность селективного маркера может быть результатом увеличения экспрессии селективного маркера. Таким образом, для повышения уровней экспрессии данного селективного маркера может быть использован промотор. Промоторы, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются ими, промотор CMV, промотор PGK и промотор CAG. В одном  
20 варианте реализации изобретения для экспрессии селективного маркера используют промотор убиквитина (hUb) человека. См. публикацию Valenzuela et al. (2003) Nature Biotechnology 21:652-659, включенную в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

В одном варианте реализации изобретения крысиная ЭС клетка сохраняет свою  
25 плюрипотентность для развития во множество типов клеток после одного цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой. В другом варианте реализации изобретения крысиная ЭС клетка сохраняет свою плюрипотентность для развития во множество типов клеток после второго цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после третьего цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой,  
30 после четвертого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после пятого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после шестого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после седьмого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после восьмого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после девятого цикла  
35 электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после десятого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после одиннадцатого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после двенадцатого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после тринадцатого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой, после четырнадцатого цикла  
40 электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой и/или после пятнадцатого цикла электропорации с экзогенной нуклеиновой кислотой. В других вариантах реализации изобретения крысиная ЭС клетка способна к передаче целевой генетической модификации потомству после очередного цикла электропорации (т.е. по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше раундов электропорации).

45 i. Введение последовательностей в крысиную эмбриональную стволовую клетку  
Способы, представленные в настоящем документе, включают введение в клетку одной или больше полинуклеотидных или полипептидных конструкций, содержащих различные композиции, необходимые для выполнения целевой геномной модификации.

«Введение» означает предоставление в клетку последовательности (полипептидной или полинуклеотидной) таким образом, что последовательность получает доступ к внутренней части клетки. Способы, представленные в данном документе, не зависят от конкретного способа введения любого компонента системы целевой геномной интеграции в клетку, а только от того, получил ли полинуклеотид доступ к внутренней части по меньшей мере одной клетки. Способы введения полинуклеотидов в различные типы клеток известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, способы стабильной трансфекции, способы временной трансфекции и вирус-опосредованные способы. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, электропорацию, внутрицитоплазматическую инъекцию, инфицирование вирусом (включая аденовирусные, лентивирусные и ретровирусные векторы), трансфекцию, опосредованную липидами трансфекцию и/или Nucleofaction™. См., например, публикацию Stadtfeld et al. (2009) *Nature Methods* 6(5):329-330; Yusaef al. (2009) *Nat. Methods* 6:363-369; Woltjen et al. (2009) *Nature* 458, 766-770. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, прямую доставку ДНК, например путем *ex vivo* трансфекции (Wilson et al., *Science*, 244:1344-1346, 1989, Nabel and Baltimore, *Nature* 326:711-713, 1987), необязательно с Fugene6 (Roche) или липофектамино (Invitrogen), посредством инъекции (патенты США №№5994624, 5981274, 5945100, 5780448, 5736524, 5702932, 5656610, 5589466 и 5580859, включены в данный документ посредством ссылки), включая микроинъекцию (Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985; патент США No. 5789215, включенные в настоящий документ путем ссылки); посредством электропорации (патент США №5384253, включенный в данный документ посредством ссылки; Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986; Potter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984); посредством преципитации фосфатом кальция (Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973; Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990); с использованием DEAE-декстрана, а потом полиэтиленгликоля (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985); посредством прямой ультразвуковой загрузки (Fechheimer et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987); посредством трансфекции, опосредованной липосомами (Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982; Fraley et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979; Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987; Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980; Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989; Kato et al., *Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991) и с помощью трансфекции, опосредованной рецепторами (Wu and Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988; Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987); и при помощи комбинации таких способов, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации изобретения клетки, используемые в способах и композициях, содержат конструкцию ДНК, стабильно включенную в их геном. Термин «стабильно включенная» или «стабильно введенная» означает введение полинуклеотида в клетку таким образом, что нуклеотидная последовательность интегрируется в геном клетки и может быть унаследована потомством клетки. Для стабильного включения конструкций ДНК или различных компонентов, используемых для создания целевой геномной модификации, может быть использован любой протокол.

Протоколы трансфекции, а также протоколы для введения полипептидных или полинуклеотидных последовательностей в клетки могут изменяться. Неограничивающие способы трансфекции включают химические способы трансфекции, которые включают использование липосом; наночастиц; фосфата кальция (Graham et al. (1973). *Virology* 52 (2): 456-67, Vacchetti et al. (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (4): 1590-4 и Kriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company, pp.

96-97); дендримеров; или катионных полимеров, таких как DEAE-декстран или полиэтиленамин. Нехимические способы включают электропорацию; сонопорацию и оптическую трансфекцию. Трансфекция частицами включает использование генной пушки, магнитную трансфекцию (Bertram, J. (2006) Current Pharmaceutical Biotechnology 7, 277-28). Для трансфекции также можно использовать вирусные способы.

Неограничивающий пример способа введения гетерологичного полинуклеотида в крысиную ЭС клетку описан ниже. Крысиные ЭС клетки, описанные в данном документе, пересевают в течение от около 24 до около 48 часов до электропорации. Примерно за 24 часа до электропорации среду меняют на RVG2i+ROCKi (10 мкМ Y-27632). Крысиные ЭС клетки обрабатывают трипсином и крысиные ЭС клетки изолируют. Крысиные ЭС клетки суспендируют до достижения конечной концентрации клеток от около  $2 \times 10^6$  до около  $10 \times 10^6$  клеток на 75 мкл. Около 75Я, крысиных ЭС клеток добавляют к около 50А, ДНК, содержащей гетерологичный полинуклеотид, и добавляют около 125Х, буфера EP. В одном неограничивающем варианте реализации изобретения электропорацию осуществляют со следующими параметрами: 400 В; 400 В; Q; 100 мкФ. Затем клетки культивируют в RVG2i и 10 мкМ ROCKi, и их можно переносить на питающие клетки.

ii. Отбор крысиных эмбриональных стволовых клеток, имеющих целевую геномную модификацию

Предлагаются различные способы отбора и поддержания крысиных ЭС клеток, имеющих стабильно включенную в их геном целевую генетическую модификацию. В одном неограничивающем примере при введении гетерологичного полинуклеотида в крысиную ЭС клетку способ может включать (а) предоставление *in vitro* популяции крысиных ЭС клеток; (b) введение по меньшей мере в одну крысиную ЭС клетку гетерологичного полинуклеотида, содержащего селективный маркер, функционально связанный с промотором, активным в крысиной ЭС клетке; и (c) культивирование *in vitro* популяции крысиных ЭС клеток попеременно в первой и второй культуральной среде, причем первая культуральная среда содержит эффективное количество селективного агента в течение первого периода времени, а вторая культуральная среда не содержит селективного агента, причем условия культивирования *in vitro* сохраняют плюрипотентность или тотипотентность; и тем самым обеспечивают отбор крысиных ЭС клеток, имеющих стабильно включенный в их геном гетерологичный полинуклеотид. В различных способах, посредством которых в данной популяции можно произвести отбор крысиной ЭС клетки, имеющей целевую генетическую модификацию, можно использовать систему культивирования *in vitro*, которая позволяет крысиным ЭС клеткам сохранять плюрипотентность. Таким образом, можно использовать любые культуральные среды *in vitro* и питающие клетки, описанные в данном документе.

В специфических вариантах реализации изобретения чередование первой и второй культуральной среды проводят каждые 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 часов или больше. В специфическом варианте реализации изобретения чередование первой и второй культуральной среды проводят каждые 24 часа.

Можно использовать любой подходящий селективный маркер, и соответствующий селективный агент будет присутствовать в культуральной среде в эффективной концентрации. Такие селективные маркеры включают любой из нативного, ослабленного или неослабленного селективных маркеров, описанных в данном документе. В одном варианте реализации изобретения используемый селективный маркер придает устойчивость к антибиотику, включая, например, G418. Неограничивающие примеры

селективных маркеров включают неомицинофосфотрансферазу II (nptII) или гигромицин фосфотрансферазу (hpt).

Концентрация селективного агента является такой, которая позволяет произвести отбор крысиной ЭС клетки, имеющей селективный маркер, при сохранении плюрипотентности крысиных ЭС клеток, присутствующих в культуре. При использовании, например, G418 концентрация G418 в среде для отбора может находиться в диапазоне от около 50 мкг/мл до около 125 мкг/мл, от около 60 мкг/мл до около 125 мкг/мл, от около 70 мкг/мл до около 125 мкг/мл, от около 80 мкг/мл до около 125 мкг/мл, от около 90 мкг/мл до около 125 мкг/мл, от около 100 мкг/мл до около 125 мкг/мл, от около 110 мкг/мл до около 125 мкг/мл, от около 80 мкг/мл до около 100 мкг/мл, от около 65 мкг/мл до около 85 мкг/мл, от около 70 мкг/мл до около 80 мкг/мл. В одном варианте реализации изобретения концентрация G418 в культуре составляет 75 мкг/мл.

Среда, используемая в отборе, позволяет сохранять плюрипотентность крысиных эмбриональных стволовых клеток. Такие среды описаны подробно в других разделах настоящего документа.

Протокол отбора может быть инициирован в любое время после введения полинуклеотида, кодирующего селективный маркер, в геном крысиной ЭС клетки. В специфических вариантах реализации изобретения протокол отбора начинается через 10, 15, 20, 24, 30, 35, 40, 50, 60 или больше часов после введения селективного маркера в крысиную ЭС клетку. В одном варианте реализации изобретения протокол отбора начинается около через 2 дня после введения полинуклеотида, кодирующего селективный маркер.

Неограничивающий пример протокола отбора с использованием G418 является следующим. На день 2 (2-й день после введения полинуклеотида, кодирующего селективный маркер) популяция крысиных ЭС клеток представляет собой клетки, инкубированные в среде 2i с добавлением G418 в концентрации 75 мкг/мл. На день 3 популяция крысиных ЭС клеток представляет собой клетки, инкубированные в среде 2i без G418. На день 4 популяцию крысиных ЭС клеток инкубируют в среде 2i с добавлением G418 в концентрации 75 мкг/мл. На день 5 популяция крысиных ЭС клеток представляет собой клетки, инкубированные в среде 2i без G418. На день 6 популяцию крысиных ЭС клеток инкубируют в среде 2i с добавлением G418 в концентрации 75 мкг/мл. На день 7 популяцию крысиных ЭС клеток инкубируют в среде 2i без G418. На день 8 популяцию крысиных ЭС клеток инкубируют в среде 2i без добавления G418 в концентрации 75 мкг/мл. На день 9 популяция крысиных ЭС клеток представляет собой клетки, инкубированные в среде 2i без G418. На день 10 популяция крысиных ЭС клеток представляет собой клетки, инкубированные в среде 2i с добавлением G418 в концентрации 75 мкг/мл. На день 11 популяция крысиных ЭС клеток представляет собой клетки, инкубированные в среде 2i без G418. На день 12 выбирают колонии для роста и скрининга.

После отбора крысиных ЭС клеток, имеющих селективный маркер, можно увеличивать количество колоний. В специфических вариантах реализации изобретения период роста для увеличения их количества может составлять 1, 2, 3, 4, 5 или больше дней в условиях культивирования, которые поддерживают плюрипотентность клеток. В одном неограничивающем варианте реализации настоящего изобретения отобранные колонии растут в течение 3 дней. В дополнительном варианте реализации изобретения используемая среда представляет собой среду 2i. Каждый клон можно пересевать и выращивать дальше.

Крысиные ЭС клетки и линии клеток, имеющие одну или больше целевых генетических

модификаций, могут иметь одно или более из следующих свойств:

- (a) обладают компетентностью зародышевой линии после целевой генетической модификации, что означает, что при имплантации крысиной ЭС клетки в крысиный эмбрион-хозяин целевая генетическая модификация в геноме линии крысиных ЭС клеток передается потомству;
- (b) обладают плюрипотентностью *in vitro*;
- (c) обладают тотипотентностью *in vitro*;
- (d) при культивации *in vitro* свободно прикрепляются к фидерному клеточному слою;
- (e) при культивации *in vitro* образуют сфероподобные колонии при посеве на фидерный клеточный слой *in vitro*;
- (f) сохраняют плюрипотентность при культивации *in vitro* в условиях, включающих фидерный клеточный слой, который не является генетически модифицированным для экспрессии фактора ингибирования лейкемии (LIF), причем культуральная среда содержит достаточную концентрацию LIF;
- (g) сохраняют плюрипотентность при культивации *in vitro* в условиях, включающих фидерный клеточный слой, причем культуральная среда содержит мышинный LIF или его активный фрагмент;
- (h) имеют молекулярную сигнатуру, которая характеризуется следующим:
- i) экспрессией одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, включая белок, связанный с адгезионными контактами (Ajal1), клаудин 5 (Cldn5), фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимую протеинкиназу IV (Camk4), эфрин-A1 (Efna1), EPH рецептор A4 (Epha4), белок бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белок 1, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкин 36 бета (Ilf8), рецептор альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактор 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептор 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейрональный рецептор пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазу нерецепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокс 2 каудального типа (Cdx2), повторные домены 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер (Lef1), ген 3, подобный Sal (дрозофила) (Sall3), гомеобокс 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинацию;
- ii) экспрессией по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, включая белок, связанный с адгезионными контактами (Ajal1), клаудин 5 (Cldn5), фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимую протеинкиназу IV (Camk4), эфрин-A1 (Efna1), EPH рецептор A4 (Epha4), белок бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белок 1, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкин 36 бета (Ilf8), рецептор альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактор 1 детерминации асимметрии (Lefty 1), альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептор 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейрональный рецептор пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазу нерецепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокс 2 каудального типа (Cdx2), повторные домены 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), ген, родственник hairy/enhancer-of-

split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер (Lef1), ген 3, подобный Sal (дрозофила) (Sall3), гомеобокс 1 SATB (Satb1), miR-632 или их комбинацию;

iii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 14, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

iv) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 14, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

v) экспрессией одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в таблице 13;

vi) экспрессией по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13;

vii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

viii) по меньшей мере 20-кратным повышением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 13, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

ix) по меньшей мере 20-кратным снижением экспрессии одного или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 12, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4; и/или

x) по меньшей мере 20-кратным снижением экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов, специфических для крысиных ЭС клеток, как указано в Таблице 12, по сравнению с ЭС клеткой мышей линии F1H4;

xi) любой комбинацией экспрессии генов, специфических для крысиных ЭС клеток согласно разделам (i)-(x);

xii) уровнем относительной экспрессии маркеров плюрипотентности, как показано в таблице 15, для по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 перечисленных маркеров плюрипотентности. См. уровни относительной экспрессии в колонке ранжирования плюрипотентности Таблицы 15;

xiii) уровнем относительной экспрессии мезодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3 или 4 перечисленных мезодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке мезодермального ранжирования Таблицы 15;

xiv) уровнем относительной экспрессии эндодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 перечисленных эндодермальных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке эндодермального ранжирования Таблицы 15;

xv) уровнем относительной экспрессии нейронных маркеров, как показано в Таблице 15, для по меньшей мере 2 и 3 перечисленных нейронных маркеров. См. уровни относительной экспрессии в колонке нейронного ранжирования Таблицы 15;

xvi) уровнем относительной экспрессии трофэктодермальных маркеров, как показано в Таблице 15, для перечисленных трофэктодермальных маркеров. См. уровни

относительной экспрессии в колонке трофэктодермального ранжирования Таблицы 15;

xvii) любым уровнем относительной экспрессии одного или более (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) маркеров плюрипотентности, мезодермальных маркеров, эндодермальных маркеров, нейронных маркеров и/или трофэктодермальных маркеров, приведенных в Таблице 15;

xviii) уровнем относительной экспрессии каждого из маркеров, приведенных в Таблице 15;

xix) любой комбинацией сигнатур, приведенных в разделах xii-xiix; и/или

xx) любой комбинацией сигнатур, приведенных в разделах i-xiix.

(i) обладают способностью продуцировать крысу F0;

(j) способны к субкультивированию и поддержанию недифференцированного состояния;

(k) имеют то же количество хромосом, что и клетка нормальной крысы;

(l) сохраняют плюрипотентность *in vitro* без потребности в паракринной сигнализации LIF; и/или

(m) обладают способностью самообновления, что означает, что они делятся бесконечно, сохраняя плюрипотентность.

iii. Кассеты экспрессии

Термины «полинуклеотид», «полинуклеотидная последовательность», «последовательность нуклеиновой кислоты» и «фрагмент нуклеиновой кислоты» используются в данном документе взаимозаменяемо. Эти термины охватывают нуклеотидные последовательности и т.п. Полинуклеотид может быть полимером РНК или ДНК, который является одно- или двухцепочечным и необязательно содержит синтетические, неприродные или измененные нуклеотидные основания. Полинуклеотид в форме полимера ДНК может состоять из одного или больше сегментов кДНК, геномной ДНК, синтетической ДНК или их смесей. Полинуклеотиды могут содержать дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды, включая как молекулы, встречающиеся в природе, так и синтетические аналоги и их любую комбинацию. Полинуклеотиды, представленные в данном документе, также охватывают все формы последовательностей, включая, но не ограничиваясь этим, одноцепочечные формы, двухцепочечные формы, шпильки, структуры типа «стебель - петля» и т.п.

Дополнительно представлены рекомбинантные полинуклеотиды. Термины «рекомбинантный полинуклеотид» и «конструкция рекомбинантной ДНК» используются в данном документе взаимозаменяемо. Рекомбинантная конструкция содержит искусственную или гетерологичную комбинацию последовательностей нуклеиновых кислот, например регуляторных и кодирующих последовательностей, которые вместе в природе не встречаются. В других вариантах реализации изобретения рекомбинантная конструкция может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из одного и того же источника, но расположены способом, отличным от встречающегося в природе. Такая конструкция может быть использована сама по себе или может быть использована в сочетании с вектором. Если используется вектор, то выбор вектора зависит от способа, который будет использоваться для трансформации клеток-хозяев, как хорошо известно специалисту в данной области. Например, может использоваться плазмидный вектор. В настоящем документе предложены генетические элементы, необходимые для успешной трансформации, селекции и размножения клеток-хозяев,

содержащих любой из выделенных фрагментов нуклеиновой кислоты. Скрининг можно провести, среди прочего, саузерн-анализом ДНК, нозерн-анализом экспрессии мРНК, анализом иммуноблоттинга экспрессии белка или фенотипическим анализом.

В специфических вариантах реализации изобретения один или больше компонентов, описанных в данном документе, могут быть предоставлены в кассете экспрессии для экспрессии в крысиной клетке. Кассета может включать 5' и 3' регуляторные последовательности, функционально связанные с полинуклеотидом, представленным в данном документе. «Функционально связанный» означает функциональную связь между двумя или больше элементами. Например, функциональная связь между полинуклеотидом, представляющим интерес, и регуляторной последовательностью (т.е. промотором) является функциональным звеном, которое позволяет экспрессию полинуклеотида, представляющего интерес. Функционально связанные элементы могут быть непрерывными или не непрерывными. При использовании для обозначения соединения двух кодирующих белок областей «функционально связанный» означает, что кодирующие области находятся в одной рамке считывания. В другом случае последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, может быть, функционально связана с регуляторными последовательностями {например, последовательностью промотера, энхансера, сайленсера и т.п.) таким образом, чтобы сохранить надлежащее регулирование транскрипции. Кассета может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный полинуклеотид, представляющий интерес, для совместного введения в крысиную ЭС клетку. В альтернативном варианте дополнительный полинуклеотид, представляющий интерес, может быть представлен на множестве кассет экспрессии. Такая кассета экспрессии представлена со множеством сайтов рестрикции и/или сайтов рекомбинации для инсерции рекомбинантного полинуклеотида, который должен находиться под транскрипционным контролем регуляторных областей. Кассета экспрессии может дополнительно содержать селективные маркерные гены.

Кассета экспрессии может включать в 5'-3' направлении транскрипции, область инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), рекомбинантный полинуклеотид, представленный в данном документе, и область терминации транскрипции и трансляции (т.е. область терминации), функциональный в клетке млекопитающего или клетке-хозяину, представляющей интерес. Регуляторные области (т.е. промоторы, области, регулирующие транскрипцию и области терминации трансляции) и/или полинуклеотид, представленный в настоящем документе, могут быть нативными/аналогичными клетке-хозяину или друг другу. В альтернативном варианте регуляторные области и/или полинуклеотид, представленный в данном документе, могут быть гетерологичными клетке-хозяину или друг другу. Например, промотор, функционально связанный с гетерологичным полинуклеотидом, происходит от видов, отличных от видов, из которых был получен полинуклеотид, или, если он происходит из тех же/аналогичных видов, один или оба по сути изменены по сравнению с их первоначальной формой и/или геномным локусом, или промотор не является природным промотором для функционально связанного полинуклеотида. В альтернативном варианте регуляторные области и/или рекомбинантный полинуклеотид, представленные в данном документе, могут быть полностью синтетическими.

Область терминации может быть нативной с областью инициации транскрипции, может быть нативной с функционально связанным рекомбинантным полинуклеотидом, может быть нативной с клеткой-хозяином или может быть получена из другого источника (например, чужеродного или гетерологичного) промотера, рекомбинантного

полинуклеотида, клетки-хозяина или любой их комбинации.

При подготовке кассеты экспрессии различными фрагментами ДНК можно манипулировать таким образом, чтобы предоставить последовательности ДНК в правильной ориентации. С этой целью могут быть использованы адаптеры или линкеры, чтобы присоединить фрагменты ДНК, или могут быть использованы другие манипуляции для обеспечения подходящих сайтов рестрикции, удаление избыточной ДНК, удаление сайтов рестрикции и т.п. С этой целью может быть использован *in vitro* мутагенез, восстановление праймеров, рестрикция, отжиг, перезамещения, например переходы и трансверсии.

В кассетах экспрессии, представленных в данном документе, может использоваться ряд промоторов. Промоторы могут быть выбраны на основе желаемого результата. Следует понимать, что различные виды применения могут быть улучшены за счет использования в кассетах экспрессии различных промоторов для модулирования выбора времени, расположения и/или уровня экспрессии полинуклеотида, представляющего интерес. Такие конструкции экспрессии также могут содержать, при желании, регулируемую область промотора (например, одну придающую индуцибельность, конститутивную, регулируемую условиями окружающей среды или развития, либо клеточно- или тканеспецифическую/селективную экспрессию), начало сайта инициации транскрипции, сайт связывания рибосом, сигнал обработки РНК, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

iv. Создание крысиных эмбрионов F0 и потомства F1 с целевой генетической модификацией

Для создания генетически модифицированных крыс можно использовать различные композиции и способы, предложенные в настоящем документе. Такие способы обычно включают (а) введение в геном выделенной крысиной ЭС клетки, описанной в данном документе, целевой генетической модификации для получения генетически модифицированной крысиной ЭС клетки, имеющей генетическую модификацию; (b) имплантацию по меньшей мере одной из генетически модифицированных крысиных ЭС клеток, имеющих генетическую модификацию, в крысиный эмбрион-хозяин для создания эмбриона F0; (c) имплантацию эмбриона F0 суррогатной матери; (d) созревание эмбриона F0 в организме суррогатной матери до соответствующего срока; и (e) идентификацию крыс F0, имеющих генетическую модификацию.

Генетически модифицированные крысиные ЭС клетки, имеющие генетическую модификацию, могут быть имплантированы в крысиный эмбрион-хозяин из той же крысиной линии или из другой крысиной линии. Например, генетически модифицированная крысиная ЭС клетка линии DA может быть имплантирована в крысиный эмбрион-хозяин линии DA или может быть имплантирована в эмбрион-хозяин линии SD, эмбрион-хозяин линии ACI или другой гетерологичный крысиный эмбрион-хозяин. Подобным образом, генетически модифицированная крысиная ЭС клетка линии ACI может быть введена в крысиный эмбрион-хозяин линии ACI или может быть введена в крысиный эмбрион-хозяин линии SD, эмбрион-хозяин линии DA или другой гетерологичный крысиный эмбрион-хозяин. Точно так же, суррогатная мать может быть из той же линии крыс, что и генетически модифицированная крысиная клетка и/или крысиный эмбрион-хозяин, или суррогатная мать может быть из другой линии крыс, а не из той, что генетически модифицированная крысиная клетка и/или крысиный эмбрион-хозяин. В одном неограничивающем варианте реализации изобретения генетически модифицированная крысиная клетка происходит от линии DA, эмбрион-хозяин происходит от эмбриона-хозяина линии SD, и суррогатная мать

происходит от линии DA. В другом неограничивающем варианте реализации изобретения генетически модифицированная крысиная клетка происходит от линии ACI, эмбрион-хозяин происходит от линии SD, и суррогатная мать происходит от линии DA.

5 В дополнительных вариантах реализации изобретения химерных крыс (F0) можно разводить для получения потомства F1, которое является гетерозиготным по целевой генетической модификации. Кроме того, самцов крыс потомства F1 можно скрещивать с самками крыс потомства F1 с получением потомства F2, являющегося гомозиготным по генетической модификации.

10 Способы и композиции, предложенные в данном документе, обеспечивают получение по меньшей мере 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или больше крыс F0 F0, имеющих генетическую модификацию для передачи генетической модификации потомству F1.

15 В некоторых вариантах реализации изобретения крысиные ЭС клетки, имеющие целевую генетическую модификацию, вводят в эмбрион стадии преморулы из соответствующего организма, например, мышинный эмбрион на стадии 8 клеток. См., например, патенты US 7576259, US 7659442, US 7294754 и US 2008-0078000 A1, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В других вариантах реализации изобретения F0g, донорские крысиные ЭС клетки, могут быть имплантированы в эмбрион-хозяин на стадии 4 клеток, на стадии 8 клеток.

20 Крысиные эмбрионы, содержащие генетически модифицированные крысиные ЭС клетки, инкубируют до стадии бластоцисты, а затем имплантируют суррогатной матери для получения потомства F0. Крысы, несущие генетически модифицированный геномный локус, могут быть идентифицированы с помощью анализа модификации аллеля (МОА), как описано в данном документе. Полученное в результате из генетически  
25 модифицированных крысиных ЭС клеток потомство F0 скрещивают с крысой дикого типа с получением потомства поколения F1. После генотипирования с использованием специфических праймеров и/или зондов, F1 крыс, гетерозиготных по генетически модифицированному геномному локусу, скрещивают друг с другом, чтобы получить крысу, гомозиготную по генетически модифицированному геномному локусу.

30 Дополнительно представлен эмбрион крысы F0, содержащий внутреннюю клеточную массу, содержащую по меньшей мере одну гетерологичную стволовую клетку, включающую любую из крысиных ЭС клеток, представленных в данном документе. В других вариантах реализации изобретения представлено потомство крысиного эмбриона F0, в котором по меньшей мере 50%, 60%, 70% или больше потомства F0  
35 получено от генетически модифицированной крысиной ЭС клетки, как описано в настоящем документе.

В одном аспекте предложен способ получения крысиной ЭС клетки, включая получение крысиной клетки из эмбриона крысы на стадии морулы, эмбриона крысы на стадии бластоцисты или эмбриона крысы на стадии развития между эмбрионом на  
40 стадии морулы и эмбрионом на стадии бластоцисты, и культивирование крысиной клетки из крысиного эмбриона в условиях, достаточных для сохранения плюрипотентности и/или тотипотентности. В одном варианте реализации изобретения условия, достаточные для сохранения плюрипотентности и/или тотипотентности, включают среду 2i.

45 В одном аспекте предложен способ получения генетически модифицированной крысы, включающий стадию модификации генома крысиной ЭС клетки последовательностью нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, с образованием модифицированной крысиной ЭС клетки, и использование модифицированной крысиной

ЭС клетки в качестве донорской крысиной ЭС клетки, объединение донорской крысиной ЭС клетки с крысиным эмбрионом-хозяином, культивирование донорской ЭС клетки и крысиного эмбриона-хозяина и использование культивированного эмбриона-хозяина с получением генетически модифицированной крысы.

5 В одном аспекте предложен способ получения генетически модифицированного потомства крыс F1, включающий стадию модификации генома крысиной ЭС клетки последовательностью нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, с образованием модифицированной крысиной ЭС клетки, и использование модифицированной крысиной ЭС клетки в качестве донорской крысиной ЭС клетки, объединение донорской крысиной ЭС клетки с крысиным эмбрионом-хозяином, культивирование донорской ЭС клетки  
10 ЭС клетки с крысиным эмбрионом-хозяином, культивирование донорской ЭС клетки и крысиного эмбриона-хозяина и использование культивированного эмбриона-хозяина с получением генетически модифицированной крысы, причем около 3%, около 10% или больше, или около 63% или больше получено из генетически модифицированной донорской крысиной ЭС клетки.

15 В одном варианте реализации изобретения культивированный эмбрион-хозяин имплантируют суррогатной матери-крысе, и происходит развитие плода из культурального эмбриона-хозяина в организме суррогатной матери.

В одном аспекте предложен способ передачи с высокой частотой генетической модификации из крысиной плюрипотентной клетки крысиному потомству, включающий  
20 генетическую модификацию плюрипотентной крысиной клетки последовательностью нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, в бактериальной искусственной хромосоме с образованием генетически модифицированной крысиной плюрипотентной клетки, и использование генетически модифицированной крысиной плюрипотентной клетки с крысиным эмбрионом-хозяином в организме суррогатной матери для создания  
25 потомства, содержащего генетическую модификацию, и, необязательно, разведение потомства.

В одном аспекте предложен способ получения крысиной ЭС клетки, причем этот способ включает культивирование замороженного эмбриона на стадии 8 клеток до  
30 стадии бластоцисты и получение из культивированной бластоцисты крысиной клетки, культивирование крысиной клетки в условиях, достаточных для сохранения плюрипотентности и/или тотипотентности.

#### V. Варианты, фрагменты и идентичность последовательностей

Активные варианты и фрагменты описанного полипептида LIF, в частности мышинового полипептида LIF, представлены в данном документе. Термин «варианты»  
35 относятся к по существу сходным последовательностям. Используемый в данном документе термин «вариант полипептида» означает полипептид, полученный из нативного белка путем делеции (так называемого усечения) одной или больше аминокислот в N-концевом и/или C-концевом участке нативного белка; делеции и/или добавления одной или больше аминокислот в одном или больше внутренних сайтах в  
40 нативном белке, или замены одной или больше аминокислот в одном или больше сайтах нативного белка. Варианты полипептидов продолжают обладать желаемой биологической активностью нативного полипептида, то есть они ингибируют дифференциацию крысиных и/или мышинных эмбриональных стволовых клеток и вносят вклад в самообновление стволовых клеток. Вариант полипептида, описанный в данном  
45 документе (т.е. SEQ ID NO: 1 или с номером доступа SwissProt P09056), как правило, будет иметь по меньшей мере около 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с эталонной последовательностью.

Термин «фрагмент» относится к части аминокислоты, содержащей специфическое количество смежных аминокислот. В конкретных вариантах реализации изобретения фрагмент полипептида, описанного в данном документе, может сохранять биологическую активность полноразмерного полипептида и, следовательно, ингибировать дифференциацию крысиных и/или мышинных эмбриональных стволовых клеток и вносить вклад в самообновление стволовых клеток. Фрагменты полипептида, описанные в настоящем документе (т.е. SEQ ID NO: 1 или номер доступа SwissProt No. P09056), могут содержать по меньшей мере 10, 15, 25, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 смежных аминокислот, или вплоть до общего числа аминокислот, присутствующих в полноразмерном белке.

Используемый в данном документе термин «идентичность последовательностей» или «идентичность» в контексте двух полинуклеотидов или полипептидных последовательностей ссылается на остатки в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия в определенном окне сравнения. При использовании процента идентичности последовательностей со ссылкой на белки следует понимать, что положения неидентичных остатков часто отличаются консервативными аминокислотными заменами, при которых аминокислотные остатки замещены другими аминокислотными остатками со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью) и, следовательно, не изменяют функциональные свойства молекулы. В тех случаях, когда последовательности отличаются консервативными заменами, процент идентичности последовательностей может быть скорректирован в сторону повышения для коррекции консервативной природы замены. О последовательностях, которые различаются такими консервативными заменами, говорят, что они имеют «сходство последовательностей» или «сходство». Способы осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. Обычно они включают в себя учет консервативной замены как частичного, а не полного несоответствия, увеличивая, таким образом, процент идентичности последовательностей. Следовательно, например, если идентичная аминокислота имеет коэффициент 1, а неконсервативное замещение имеет коэффициент нуль, консервативное замещение имеет коэффициент между нулем и 1. Подсчет консервативных замещений проводится, например, в соответствии с алгоритмом программы PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

В данном документе термин «процент идентичности последовательностей» означает величину, определенную путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей через окно сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (например, гэпы) в сравнении с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают путем определения количества положений, в которых идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотные остатки присутствуют в обеих последовательностях, для получения числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей.

Если не указано иное, значения идентичности/схожести последовательностей, представленных в данном документе, относятся к значению, полученному с использованием программного обеспечения GAP версии 10 с использованием следующих параметров: % идентичности и % сходства для нуклеотидной последовательности с

применением значений веса ГЭП 50 и веса длины 3, и матрицы подсчета `nwsgapdna.cmp`; % идентичности или % сходства для аминокислотной последовательности с применением значений веса ГЭП 8 и веса длины 2 и матрицы подсчета `BLOSUM62` или эквивалентной программы. Под «эквивалентной программой» подразумевают любую программу сравнения последовательностей, которая для любых двух рассматриваемых последовательностей производит выравнивание, имеющее идентичные совпадения нуклеотидных или аминокислотных остатков и идентичный процент идентичности последовательностей по сравнению с соответствующим выравниванием, произведенным посредством программы GAP версии 10.

Приведенные ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1: Деривация крысиных ЭС клеток.

Характеристика кЭСК. Как показано на ФИГ. 1, кЭСК растут в виде компактных сферических колоний, которые обычно не прикреплены и плавают в чашке для культивирования (крупный план на ФИГ. 4). В, С, F, G: кЭСК экспрессируют маркеры плюрипотентности, включая Oct-4 (ФИГ. 2A) и Sox2 (ФИГ. 2B) и экспрессируют высокие уровни щелочной фосфатазы (ФИГ. 3, левая панель). Кариотип для линии DA.2B представляет собой 42X,Y (ФИГ. 3, правая панель). кЭСК часто становятся тетраплоидными; таким образом, проводят предварительный скрининг линий путем подсчета препаратов метафазных хромосом; линии в основном с нормальным количеством затем формально кариотипируют.

Бластоцисты АС1 собирают от коммерчески приобретенных самок с суперовуляцией; культивируют бласты DA от коммерчески приобретенных замороженных 8-клеточных эмбрионов. Блестящую оболочку яйцеклетки удаляют с использованием кислоты Тироде, и бласты высевают на митотически инактивированные МЭФ. Разрастания собирают и выращивают с использованием стандартных способов. Все бласты высевают, культивируют и выращивают с использованием среды 2i (публикация Li et al. (2008) Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts, Cell 135:1299-1310; включена в данный документ посредством ссылки).

35

40

45

Таблица 3. Деривация крысиных ЭС клеток

	АСI	DA
Источник эмбрионов	Бластоцисты (суперовуляция)	Замороженные 8-клеточные эмбрионы, культивированные до бластоцисты
Высеянные бластоцисты:	107	22
Разрастания:	32 (30% бластов)	10 (45% бластов)
Линии:	16 (50% разрастаний)	9 (90% разрастаний)
Кариотипированы:	3; все 42X,Y	6: 3 42X,X 3 42X,Y
Валидация GLT:	1 (ACI.G1)	1 42X,X (DA.2C) 1 42X,Y (DA.2B)

### Пример 2: Получение крыс

Химерных крыс получали посредством инъекции бластоцисты и трансмиссии генома кЭСК через зародышевую линию. Химеры, полученные с помощью микроинъекции бластоцисты с использованием родительской кЭСК ACI.G1, показаны на ФИГ. 5. Детеныши агуты F1 из помета с альбиносами, произведенными от химеры ACI/SD, помеченной звездочкой (\*) на ФИГ. 5, показаны на ФИГ. 6.

Трансмиссия через зародышевую линию родительской кЭСК. Три линии эуплоидной кЭСК оценивали на плюрипотентность путем микроинъекции в бластоцист альбиносов SD. Химеры были идентифицированы по окрасу покрова агуты, указывающему на вклад кЭСК. В каждой линии большинство химер передало геном кЭСК потомству F1 (Таблица 4).

Линия	Порода химер	Передачики зародышевой линии	Всего детенышей от химер GLT	Детеныши, полученные из кЭСК	Эффективность GLT (%)
ACI.G1	5	3 (60%)	103	11	11
DA.2B	5	4 (80%)	129	11	9
DA.2C (XX)	3	2 (66%)	45	7	16

Пример 3: нацеливание кЭСК: Лocus Rosa 26 крыс.

Лocus rRosa26 находится между генами Setd5 и Thumpd3, как и у мыши, на том же расстоянии. Лocus rRosa 26 (ФИГ. 7, панель В) отличается от локуса mRosa 26 (ФИГ. 7, панель А). Транскрипты mRosa26 состоят из 2 или 3 экзонов. Крысиный лocus содержит 2-й экзон 1 (Ex1b) в дополнение к гомологичному экзону мышинового экзона 1 (Ex1a). У крыс не был выявлен 3-й экзон. Нацеливание на аллель rRosa26 показано на ФИГ. 7, панель С, где группы гомологии по 5 тысяч оснований каждая клонировали с помощью ПЦР с использованием геномной ДНК от кЭСК DA. Целевой аллель содержит кассету SA-lacZ-hUB-neo, замещающую делецию 117 п.о. в интроне rRosa26.

Определяли целевую эффективность локуса rRosa 26 (Таблица 5). Линеаризованный вектор вводили с помощью электропорации в кЭСК линии DA или ACI, и трансфицированные колонии культивировали в среде 2i с добавлением G418, с использованием стандартных способов. Отдельные колонии собирали и подвергали скринингу с использованием анализа утраты аллеля (Loss of Allele, LOA) (публикация Valenzuela, D. et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21:652-660, включена в данный документ посредством ссылки).

Клеточная линия	Собранные колонии	Вновь подтвержденные положительные	Целевая эффективность (%)
DA.2B	192	4	2,1
ACI.G1	96	4	4,2

Получение химеры и трансмиссия через зародышевую линию и с использованием целевой Rosa26 кЭСК. Вновь подтвержденные целевые клоны rRosa26 вводили путем

микроинъекции в бластоцисты SD, которые затем переносили самкам-реципиентам DS с ложной беременностью, с использованием стандартных способов. Химеры были идентифицированы по окрасу покрова; самцов химер F0 скрещивали с самками SD. Зародышевую линию (агути) F1 детенышей генотипировали на наличие целевого аллеля Rosa26; девять из 22 детенышей агути генотипировали как гетерозиготных по локусу Rosa26 (Таблица 6).

Таблица 6. Трансмиссия через зародышевую линию с использованием целевой Rosa26 кЭСК

Клеточная линия	Инъцирированные клоны R26	Клоны, продуцирующие химеры	Клоны с трансмиссией через зародышевую линию	Всего детенышей	Детеныши, полученные из кЭСК	Детеныши, полученные из ЭСК (%)
DA.2B	4	3	2	API7: 64 AE3: 112	API7: 41 AE3: 6	API7: 63 AE3: 3
ACIG1	4	4	1	DE9: 39	DE9: 4	10

Пример 3: Деривация крысиных эмбриональных стволовых клеток.

Протокол суперовуляции для крыс

День 0: вводят инъекцию сыворотки беременной кобылы: ИП, 20 Ед (0,4 мл). День 1: действий не проводят

День 2: (через 46 часов): вводят инъекцию hCG, ИП, 50 Ед (1 мл). - проводят спаривания самок по одной.

День 3: проверяют наличие копулятивных пробок. У самок имеются копулятивные пробки. Это день 0,5.

День 6 (e3.5): Подвергают эвтаназии самок и вымывают эмбрионы.

Протокол деривации ЭС клеток (супер овуляция)

День 0:

1) Подвергают эвтаназии самок крыс с использованием CO<sub>2</sub>.

2) Протирают вентральную часть живота 70% этанола; с помощью ножниц вскрывают брюшную стенку с экспонированием внутренних органов.

3) Отсекают маточные трубы и рога матки и помещают их в чашку с культурой ткани, содержащую теплую среду N2B27. Отмывают кровь максимально, насколько это возможно, и переносят в новую чашку с N2B27.

4) Используя шприц на 1 мл и тупую иглу калибра 27G, промывают средой рога матки и маточные трубы, чтобы извлечь бластоцисты в среду.

5) Бластоцисты собирают ротовой пипеткой и переносят на чашку для культивирования эмбриона, содержащую KSOM+2i (1 мкМ PD0325901, 3 мкМ CHIR99021). KSOM представляет собой культуральную среду, производимую компанией Millipore. Номер по каталогу MR-106-D.

6) Культивирование проводят в течение ночи при температуре 37°C; 7,5% CO<sub>2</sub>.

Протокол деривации ЭС клеток (замороженные эмбрионы)

День 0:

1) Оттаивают замороженные 8-клеточные эмбрионы (приобретенные из коммерческих источников) в среде M2. Культивирование проводят в течение 10 минут при комнатной

температуре.

2) Переносят в KSOM+2i и культивируют в течение ночи.

Протокол деривации ЭС клеток (аналогичен для обоих)

День 1:

5 1) Переносят эмбрионы с наличием полости в среду 2i и культивируют в течение ночи.

2) Культивирование эмбрионов без сформированной полости продолжают в среде KSOM+2i.

День 2:

10 1) Все оставшиеся эмбрионы переносят в среду 2i (независимо от того, произошло ли образование в них полости).

2) Культивирование проводят в течение ночи; продолжают культивирование ранних эмбрионов в среде 2i.

День 3:

15 1) Перенесенные эмбрионы обрабатывают 30-60 секунд кислотой Тироде для удаления блестящей оболочки яйцеклетки.

2) Эмбрионы промывают 3 раза в среде 2i для удаления кислоты Тироде.

3) Каждый эмбрион депонируют в отдельной лунке 96-луночного питающего планшета (лунка содержит монослой митотически инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ)).

4) Культивирование проводят в течение ночи в среде 2i.

День 4-5:

1) Высеянные эмбрионы наблюдают на наличие разрастания (аморфная недифференцированная масса клеток). Разрастания готовы для переноса, когда их размер увеличивается в два раза по сравнению с размером высеянного эмбриона.

2) Каждый день истощенную среду удаляют микропипеткой и заменяют свежей средой 2i.

3) Переносят разрастания в новые питающие лунки:

а. Удаляют истощенную среду, и лунки аккуратно промывают ФСБ.

30 б. Удаляют ФСБ и добавляют 30 мкл 0,05% трипсина; инкубируют в течение 10 минут.

с. Реакцию с трипсином останавливают добавлением 30 мкл среды 2i и 10% ФБС.

d Клетки осторожно диссоциируют микропипеткой, и все содержимое лунки переносят в новую лунку в 24-луночный фидерный планшет. Это называют «пересев 1» (P1).

35 е. Культивирование проводят в течение ночи в среде 2i.

День 5-8: (выбор времени зависит от того, как быстро растет каждая линия)

1) Среду меняют каждый день (среда 2i) и наблюдают на наличие колоний, имеющих морфологию ЭСК.

2) После того, как появляются такие колонии, культивирование продолжают до достижения ~50% слияния.

3) Колонии подвергают воздействию трипсина и пересевают как раньше; высевают на питающие планшеты, 1 лунка на линию, в 6-луночную чашку. Это называют «пересев 2» (P2).

Продолжение:

45 1) Питание и наблюдение за каждой линией продолжают до тех пор, пока не произойдет около 50% слияния.

2) Клетки, как обычно, обрабатывают трипсином.

3) Реакцию с трипсином останавливают добавлением среды 2i и 10% ФБС; клетки

осаждают центрифугированием (5 минут, 1200 оборотов в минуту в настольной центрифуге Beckman-Coulter).

4) Аспирируют супернатант, и осторожно ре суспендируют клетки в 400 мкл среды для замораживания (70% 2i, 20% ФБС, 10% ДМСО).

5) Клетки распределяют в 2 флакона и замораживают при температуре -80°. Это называют «пересев 3» (P3).

б) Для длительного хранения флаконы переносят на хранение в жидкий N<sub>2</sub>.

Среду 2i готовят так, как показано ниже в Таблице 7.

Реагент	Поставщик	Концентрация
DMEM/F12 базовая среда	Invitrogen/Life Technologies	1 x
среда Neurobasal	Invitrogen/Life Technologies	1 x
Пенициллин/стрептомицин	Invitrogen/Life Technologies	1%
L-глутамин	Invitrogen/Life Technologies	4 мМ
2-меркаптоэтанол	Invitrogen/Life Technologies	0,1 мМ
добавка N2	Invitrogen/Life Technologies	1 x
добавка B27	Invitrogen/Life Technologies	1 x
LIF	Millipore	100 Ед/мл
PD0325901 (ингибитор MEK).	Stemgent	1 мкМ
CHIR99021 (ингибитор GSK).	Stemgent	3 мкМ

40 Материалы: Гонадотропин сыворотки беременной кобылы (PMSG)

Хорионический гонадотропин человека из мочи беременной женщины (HCG)

Самки крыс (в возрасте 5-12 недель)

Самцы крыс (в возрасте от 12 недель до 8 месяцев), один на клетку

Шприцы/иглы

45 Виварий с освещением с 6:00 до 18:00

Процедура:

День 1: 8:00-10:00 утра

Введение самкам инъекций 20 МЕ PMSG (0,4 мл), ИП

Утилизация неиспользованного PMSG.

День 3: 8:00-10:00 утра (через 48 часов после инъекции PMSG)

Введение самкам инъекций 50 МЕ HCG (1 мл), ИП

Размещение одной самки на одного самца в клетке для спаривания.

5 Утилизация неиспользованного HCG.

День 4: 8:00-10:00 утра (через 24 часа после инъекции HCG)

Проверяют наличие копулятивных пробок у самок.

Поставщики гормонов

PMSG: Sigma #G-4877 (1000 ME). Ресуспендируют в ФСБ до конечной [] 50 ME/мл.

10 Хранят при температуре -20° в аликвотах по 1 мл.

HCG: Sigma #CG-5 (5000 ME). Ресуспендируют в ФСБ до конечной [] 50 ME/мл.

Хранят при температуре -20° в аликвотах по 1 мл.

Пример 4: Кариотипирование линий крысиных эмбриональных стволовых клеток.

Линию крысиных ЭС клеток, полученную в настоящем изобретении,

15 кариотипировали, результаты приведены в Таблицах 8-11.

20

25

30

35

40

45

Таблица 8

<b>Результаты кариотипирования ACI.G1</b>	<b>Количество клеток:</b>
Количество кариотипированных клеток:	7
Количество проанализированных клеток:	20
Количество клеток 42, XY	18
Количество аномальных клеток	2
40, XY, -5, -9	1
41, XY, -14	1
42, XY	18
<p>Другие примечания:</p> <p>В двух проанализированных клетках отсутствуют различные аутосомы, что может быть спорадическим случаем из-за технического артефакта. 90% проанализированных клеток имели нормальный мужской кариотип 42, XY.</p>	
На Фиг. 9 представлена фотография, демонстрирующая анализ	
числа хромосом в линии ЭС клеток крыс ACI.G1.	

Таблица 9

	<b>Результаты кариотипирования DA.2B</b>	<b>Количество клеток:</b>
5	Количество кариотипированных клеток:	6
10	Количество проанализированных клеток:	20
	Количество клеток 42, XY	20
15	Количество аномальных клеток	0
	42, XY	20
20	Другие примечания: Все проанализированные клетки имели нормальный диплоидный кариотип 42, XY.	
25	На Фиг. 10 представлена фотография, демонстрирующая анализ числа хромосом в линии ЭС клеток крыс DA.2B.	

30

Таблица 10

	<b>Результаты кариотипирования DA.C2</b>	<b>Количество клеток:</b>
35	Количество кариотипированных клеток:	5
40	Количество проанализированных клеток:	20
	Количество клеток 42, XY	20

45

Количество аномальных клеток	0
42, XX	
Другие примечания: 100% проанализированных клеток имели нормальный женский кариотип крысы XX.	
На Фиг. 11 представлена фотография, демонстрирующая анализ числа хромосом в линии крысиных ЭС клеток DA.C2.	

Таблица 11

Линия	Высеянные бластоцисты:		Кариотипированные линии	Кариотипы
	Созданные в линии			
BN x SD F1	41	8 (20%)	5	все линии имели высокий % полиплоидных комплексов
ACI	27	16 (60%)	3	G1: 90% 42 XY; остальные были на 70-85% эуплоидными
DA	20	9 (45%)	6	2B: 100% 42 XY; 2C: 100% 42 XX; остальные были на 95-100% эуплоидными
F344	4	1 (25%)	0	
<b>Всего</b>	<b>92</b>	<b>34 (37%)</b>		

Пример 5: Электропорация вектора в эмбриональную стволовую клетку крысы

1. Пересевают крысиные ЭС клетки за 24-48 часов до электропорации.
2. Производят замену среды на RVG2i+ROCKi (10 мкМ Y-27632) за 24 часа до электропорации.
3. Производят замену среды за 30 минут до обработки трипсином.
4. Делят на аликвоты ДНК для электропорации.
5. Дают возможность ДНК нагреться до КТ в течение >10 мин.
6. Нагревают ДНК в течение 5 минут при 62°C. Помещают ДНК на лед.
7. Проводят обработку клеток трипсином:
  - a. Собирают плавающие колонии. Промывают планшет, чтобы собрать максимально возможное количество плавающих колоний.
  - b. Осаждают колонии: 3 минуты при 750 оборотах в минуту.

- c. Промывают осадок 1×5-10 мл ФСБ и снова центрифугируют/осаждают.
- d Аспирируют супернатант; добавляют 500λ трипсина, 0,05%+1% куриной сыворотки.
- i. Не объединяйте более чем 1 10 см планшет с колониями на пробирку. Если в нижней части пробирки во время обработки трипсином упаковано слишком много колоний, они будут слипаться в комки и большинство клеток будет потеряно.
- 5 e. 4 минуты при 37°. Пипетируют колонии несколько раз, чтобы свести к минимуму образование комков.
- f. Повторяют стадии 1-2 X: 4 минуты при 37°.
- g. Реакцию с трипсином останавливают добавлением 500λ RVG2i+10% ФБС.
- 10 8. Осаждают клетки: 5 минут при 1200 оборотах в минуту.
9. Ре суспендируют клетки в 10 мл ФСБ. Подсчитывают две аликвоты по 20λ, чтобы определить общее число клеток.
10. Осаждают клетки (5 мин./1200 оборотов в минуту); рассчитывают общее число клеток и общий объем ресуспендирования, чтобы достичь правильной концентрации клеток (целевое кол-во/75 мкл буфера EP).
- 15 11. Ресуспендируют в минимальном объеме буфера EP; измеряют общий объем и корректируют до целевого объема с помощью буфера EP. Буфер для электропорации приобретают у Millipore. Номер по каталогу ES-003-D. См., публикацию Valenzuela et al. (2003) Nature Biotechnology 21: 652-659, которая включена в данный документ
- 20 посредством ссылки.
12. Добавляют 75λ клеток к 50λ ДНК; переносят раствор 125λ клеток/ДНК в одну лунку 48-луночной кюветы ВТХ.
- a. Наполняют пустые лунки в том же столбце 125λ буфера EP.
13. Кювету подвергают воздействию одного импульса в электропораторе ВТХ:
- 25 a. Параметры: 400 В; Ω; 100 мкФ (параметры могут изменяться)
14. Помещают кювету на лед на 15 минут для восстановления.
15. Отбирают клетки в 5 мл RVG2i+10 мкМ ROCKi.
16. Добавляют к 15 см планшету с 20 мл RVG2i+10 мкМ ROCKi. Планшет содержит 2x неоR МЭФ (или другие МЭФ в зависимости от проекта). Селективный маркер неоR
- 30 представляет собой ген неомицинофосфотрансферазы (нео), публикация Beck et al. (1982) Gene, 19: 327-36 или патент США №7205148 или 6596541, которые включены в данный документ посредством ссылки.
17. Инкубируют при 37°. Отбор начинают спустя 48 часов.
- Используемый ингибитор ROCK представлял собой Y-27632.
- 35 Пример 6: Отбор целевой генетической модификации в крысиной эмбриональной стволовой клетке
1. Пересевают клетки за 24-48 часов до электропорации.
2. Производят замену среды на RVG2i+ROCKi (10 мкМ Y-27632) за 24 часа до электропорации.
- 40 3. Производят замену среды за 30 минут до обработки трипсином.
4. Делят на аликвоты ДНК для электропорации.
5. Дают возможность ДНК нагреться до КТ в течение >10 мин.
6. Нагревают ДНК в течение 5 минут при 62°C. Помещают ДНК на лед.
7. Проводят обработку клеток трипсином:
- 45 h. Собирают плавающие колонии. Промывают планшет, чтобы собрать максимально возможное количество плавающих колоний.
- i. Осаждают колонии: 3 минуты при 750 оборотах в минуту.
- j. Промывают осадок 1×5-10 мл ФСБ и снова центрифугируют/осаждают.

- k. Аспирируют супернатант; добавляют 500 $\mu$ л трипсина, 0,05%+1% куриной сыворотки.
- i. Не объединяйте более чем 1 10 см планшет с колониями на пробирку. Если в нижней части пробирки во время обработки трипсином упаковано слишком много колоний, они будут слипаться в комки и большинство клеток будет потеряно.
- 5 1. 4 минуты при 37°. Пипетируют колонии несколько раз, чтобы свести к минимуму образование комков.
- m. Повторяют 1-2 раза: 4 минуты при 37°.
- n. Реакцию с трипсином останавливают добавлением 500 $\mu$ л RVG2i+10% ФБС.
8. Осаждают клетки: 5 минут при 1200 оборотах в минуту.
- 10 9. Ресуспендируют клетки в 10 мл ФСБ. Подсчитывают две аликвоты по 20 $\mu$ л, чтобы определить общее число клеток.
10. Осаждают клетки (5 мин./1200 оборотов в минуту); рассчитывают общее число клеток и общий объем ресуспендирования, чтобы достичь правильной концентрации клеток (целевое кол-во/75 мкл буфера EP).
- 15 11. Ресуспендируют в минимальном объеме буфера EP; измеряют общий объем и корректируют до целевого объема с помощью буфера EP.
12. Добавляют 75 $\mu$ л клеток к 50 $\mu$ л ДНК; переносят раствор 125 $\mu$ л клеток/ДНК в одну лунку 48-луночной кюветы ВТХ.
- a. Наполняют пустые лунки в том же столбце 125 $\mu$ л буфера EP.
- 20 13. Кювету подвергают воздействию одного импульса в электропораторе ВТХ:
- a. Параметры: 400 В; 400 В;  $\Omega$ ; 100 мкФ (параметры могут изменяться)
14. Помещают кювету на лед на 15 минут для восстановления.
15. Отбирают клетки в 5 мл RVG2i+10 мкМ ROCKi.
16. Добавляют к 15 см планшету с 20 мл RVG2i+10 мкМ ROCKi. Планшет содержит
- 25 2x неоR МЭФ (или другие МЭФ в зависимости от проекта).
17. Инкубируют при 37°. Отбор начинают спустя 48 часов.
18. Протокол отбора с использованием G418 является следующим:
- a. День 2 (2-й день после EP): инкубируют клетки в среде 2i с добавлением G418, 75 мкг/мл.
- 30 b. День 3: инкубируют клетки в среде 2i без G418
- c. День 4: инкубируют клетки в среде 2i с добавлением G418, 75 мкг/мл.
- d. День 5: инкубируют клетки в среде 2i без G418
- e. День 6: инкубируют клетки в среде 2i с добавлением G418, 75 мкг/мл.
- f. День 7: инкубируют клетки в среде 2i без G418
- 35 g. День 8: инкубируют клетки в среде 2i с добавлением G418, 75 мкг/мл.
- h. День 9: инкубируют клетки в среде 2i без G418
- i. День 10: инкубируют клетки в среде 2i с добавлением G418, 75 мкг/мл.
- j. День 11: инкубируют клетки в среде 2i без G418
- k. День 12: выбирают колонии для роста и скрининга. Каждую колонию диссоциируют
- 40 в 0,05% трипсине + 1% куриной сыворотке в течение 10 минут, после чего высевает в 1 лунку 96-луночного питающего планшета.
19. Выращивают колонии в течение 3 дней в среде 2i.
20. Пересевают клоны 1:1 в новые 96-луночные питающие планшеты.
21. Выращивают клоны в течение 3 дней в среде 2i.
- 45 22. Для каждого клона диссоциируют колонии в трипсине. Замораживают 2/3 каждого клона и хранят при температуре -80°; высевает оставшуюся 1/3 на ламининовые планшеты (96-луночные планшеты, покрытые 10 мкг/мл ламинина).
23. После слияния на ламининовых планшетах, переносят в лабораторию для

скрининга для генотипирования клонов.

Пример 7: Молекулярная сигнатура крысиных эмбриональных стволовых клеток

Перечисленные в Таблице 13 гены экспрессировались на 20-кратно более высоких уровнях в крысиных ЭС клетках по сравнению с соответствующими генами в мышинных ЭС клетках. Перечисленные в Таблице 12 гены экспрессировались на 20-кратно более низких уровнях в крысиных ЭС клетках по сравнению с соответствующими генами в мышинных ЭС клетках.

Данные микроматрицы в Таблицах 12 и 13 получали следующим образом. Крысиные ЭС клетки (ACI.G2 и DA.2B) и мышинные ЭС клетки (F1H4) культивировали в среде 2i в течение трех пересевов до слияния. Клетки F1H4 культивировали на планшетах, покрытых желатином, при отсутствии питающего слоя. Мышинные ЭС клетки F1H4 получали из 129S6/SvEvTac и C57BL/6NTac гетерозиготных эмбрионов (см., например, патент США №7294754 и публикации Poueymirou, W.T., Auerbach, W., Friendewey, D., Hickey, J.F., Escaravage, J.M., Esau, L., Dore, A.T., Stevens, S., Adams, N.C., Dominguez, M.G., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., DeChiara, T.M., Valenzuela, D.M. (2007), включенные в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

Следующий протокол использовали для приготовления образцов:

Материалы включали: реагент тризол; буфер для лизиса РНК (Zymo Kit); и пробирки Эппендорф объемом 1,5 мл.

На этикетках пробирок Эппендорф объемом 1,5 мл указывали идентификатор образца. Клетки, выращенные на планшете, промывали 37С ФСБ. Удаляли ФСБ и добавляли 300 мкл тризола. Для разрушения клеток в тризоле использовали шпатель. Лизированные клетки собирали в тризол в пробирки Эппендорф объемом 1,5 мл. Клетки, выращенные в суспензии, промывали 37С ФСБ. Клетки собирали в пробирки объемом 1,5 мл, клетки центрифугировали, удаляли ФСБ и добавляли 300 мкл тризола. Клетки пипетировали вверх и вниз для разрушения клеток. Образцы сортировали для FACS с  $10^1$ - $10^5$  клеток, объем концентрировали до менее чем 100 мкл. Добавляли 4 объема буфера для лизиса РНК и смешивали при помощи пипетирования. Например, к 80 мкл образца добавляли 320 мкл буфера для лизиса РНК. Образцы хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

РНК-секвенирование использовали для измерения уровня экспрессии мышинных и крысиных генов. Результаты секвенирования картировали относительно эталонного генома мыши и крысы при помощи программного обеспечения TopHat и RPKM (фрагменты на тысячу оснований экзона на миллион картированных остатков) и рассчитывали для мышинных и крысиных генов. Гены гомологии были выбраны на основе символа гена, а затем для сравнения уровня экспрессии гена между мышью и крысой использовали t-тест.

miR-632 находится в 10 наиболее экспрессируемых в ЭСК крысы, но они не экспрессировались в ЭС клетках мыши. Поэтому нет сравнительных данных для этих генов. На основании уровней экспрессии по сравнению с другими генами и их известной функции в эмбриональном развитии, экспрессию miR-632 использовали в качестве маркера для крысиных ЭС клеток.

Таблица 12. Перечисленные гены экспрессировались на 20-кратно более низких уровнях в крысиных ЭС клетках по сравнению с соответствующими генами в мышинных ЭС клетках.

ID	Примечания	Символ	Название гена в базе Entrez	Расположение	Тип (-ы)	Лекарственное средство (-а)
Abcb1b		Abcb1b	представитель 1В подсемейства В (MDR/TAP) АТФ-связывающей кассеты	Плазма Мембрана	транспортёр	
Acta2		ACTA2	актин, альфа 2, гладкая мускулатура, аорта	Цитоплазма	другие	
Actg2		ACTG2	актин, гамма 2, гладкая мускулатура, кишечный	Цитоплазма	другие	
Aebp1		AEBP1	АЕ-связывающий белок 1	Ядро	пептидаза	
Angptl2		ANGPTL2	ангиопозтин-подобный белок 2	Внеклеточное пространство	другие	
Ankrd1		ANKRD1	белок с анкириновым повтором 1 (сердечная мышца)	Цитоплазма	регулятор транскрипции	
Anxa1		ANXA1	аннексин А1	Плазма Мембрана	другие	гидрокортизон
Anxa6		ANXA6	аннексин А6	Плазма Мембрана	другие	
Anxa8		ANXA8 L2 (включая	белок 2, подобный аннексину А8	Плазма Мембрана	другие	

		ет другие)				
5	Arhgef25	ARHGEF25	фактор 25 гуанин-нуклеотидного обмена (GEF) Rho	Цитоплазма	другие	
10	Axl	AXL	рецепторная тирозинкиназа AXL	Плазма Мембрана	киназа	кабозантиниб
15	Baspl	BASP1	обильно представленный в головном мозге, прикрепленный к мембране сигнальный белок 1	Ядро	регулятор транскрипции	
	Bgn	BGN	бигликан	Внеклеточное пространство	другие	
20	Bst2	BST2	антиген стромальных клеток костного мозга 2	Плазма Мембрана	другие	
25	Btf3	BTF3	основной фактор транскрипции 3	Ядро	регулятор транскрипции	
	Btg2	BTG2	представитель семейства BTG 2	Ядро	регулятор транскрипции	
30	Capsl	CAPSL	кальцифозин-подобный белок	Другие	другие	
35	Cav1	CAV1	кавеолин 1, белок кавеолы, 22 кДа	Плазма Мембрана	трансмембранный рецептор	
	Ccdc80	CCDC80	белок 80, содержащий биспиральный домен	Ядро	другие	
40	Ccnd2	CCND2	циклин D2	Ядро	другие	
	Cd248	CD248	молекула CD248, эндосиалин	Плазма Мембрана	другие	
45	Cd44	CD44	молекула CD44 (индийская группа крови)	Плазма Мембрана	фермент	

	Cd97	CD97	молекула CD97	Плазма Мембрана	рецептор, связанный с G-белком	
5	Cdc4 2ep5	CDC42E P5	CDC42 эффекторный белок (Rho ГТФаза- связывающий) 5	Цитоплазма	другие	
10	Cdh1 1	CDH11	кадгерин 11, тип 2, ОБ-кадгерин (остеобласт)	Плазма Мембрана	другие	
15	Cdkn 2a	CDKN2 A	ингибитор циклин- зависимой киназы 2A	Ядро	регулятор транскрип ции	
	Cdo1	CDO1	цистеиндиоксиген аза 1 типа	Цитоплазма	фермент	
20	Clip3	CLIP3	линкерный белок 3, содержащий домен CAP-GLY	Цитоплазма	другие	
25	Cln5	CLN5	цериол- липофусциноз, нейрональный белок 5	Цитоплазма	другие	
	Cnn1	CNN1	кальпонин 1, основной, гладкая мускулатура	Цитоплазма	другие	
30	Colla 1	COL1A1	коллаген, тип I, альфа 1	Внеклеточное пространство	другие	коллагеназа Clostridium histolyticum
35	Colla 2	COL1A2	коллаген, тип I, альфа 2	Внеклеточное пространство	другие	коллагеназа Clostridium histolyticum
	Col3a 1	COL3A1	коллаген, тип III, альфа 1	Внеклеточное пространство	другие	коллагеназа Clostridium histolyticum
40	Col5a 2	COL5A2	коллаген, тип V, альфа 2	Внеклеточное пространство	другие	коллагеназа Clostridium histolyticum
45	Col6a 2	COL6A2	коллаген, тип VI, альфа 2	Внеклеточное пространство	другие	коллагеназа Clostridium histolyticum
	Cryab	CRYAB	кристаллин, альфа B	Ядро	другие	

	Csf1	CSF1	колониестимулирующий фактор 1 (макрофаг)	Внеклеточное пространство	цитокин	
5	Cth	CTH	цистатионаза (цистатионин гамма-лиазы)	Цитоплазма	фермент	
10	Cthrc1	CTHRC1	коллаген, содержащий повтор тройной спирали 1	Внеклеточное пространство	другие	
	Ctsc	CTSC	катепсин С	Цитоплазма	пептидаза	
15	Cyr61	CYR61	богатый цистеином, ангиогенный индуктор 61	Внеклеточное пространство	другие	
20	Ddx58	DDX58	полипептид 58 бокса DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	Цитоплазма	фермент	
	Dkk3	DKK3	ингибитор 3 сигнального пути WNT dickkopf	Внеклеточное пространство	цитокин	
25	Dmc1	DMC1	рекомбиназа 1 ДНК мейоза	Ядро	фермент	
	Dpysl3	DPYSL3	дигидропиримидиназа-подобный белок 3	Цитоплазма	фермент	
30	Dse	DSE	дерматансульфатэпимераза	Цитоплазма	фермент	
	Dusp1	DUSP1	фосфатаза 1 с двойной специфичностью	Ядро	фосфатаза	
35	Dusp27	DUSP27	фосфатаза 27 с двойной специфичностью (предполагаемая)	Другие	фосфатаза	
40	Dusp9	DUSP9	фосфатаза 9 с двойной специфичностью	Ядро	фосфатаза	
	Ece2	ECE2	эндотелин-превращающий фермент 2	Плазма Мембрана	пептидаза	
45	Ecm1	ECM1	белок 1 внеклеточного матрикса	Внеклеточное пространство	транспорт ер	

	Egr1	EGR1	белок 1 ранней реакции роста	Ядро	регулятор транскрипции	
5	Emp1	EMP1	эпителиальный мембранный белок 1	Плазма Мембрана	другие	
10	Emp3	EMP3	эпителиальный мембранный белок 3	Плазма Мембрана	другие	
15	Ephx2	EPHX2	эпоксидгидролаза 2, цитоплазматическая	Цитоплазма	фермент	
20	F3	F3	фактор свёртывания крови III (тромбопластин, тканевой фактор)	Плазма Мембрана	трансмембранный рецептор	активированный рекомбинантный человеческий фактор VII
25	Fau	FAU	повсеместно экспрессируемый вирус саркомы мышей Финкеля-Бискиса-Рейли (FBR-MuSV)	Цитоплазма	другие	
30	Fbn1	FBN1	фибриллин 1	Внеклеточное пространство	другие	
35	Fbxo15	FBXO15	белок 15 F-бокса	Другие	регулятор транскрипции	
40	Fhl2	FHL2	четыре с половиной LIM-домены 2	Ядро	регулятор транскрипции	
45	Flnc	FLNC	филамин С, гамма	Цитоплазма	другие	
	Fos	FOS	гомолог вирусного онкогена мышинной остеосаркомы FBJ	Ядро	регулятор транскрипции	
	Fundc2	FUNDC2	белок 2, содержащий домен FUN14	Цитоплазма	другие	
	Gjb3	GJB3	белок бета 3 межклеточных щелевых контактов, 31 кДа	Плазма Мембрана	транспортёр	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Gpa33		GPA33	гликопротеин A33 (трансмембранный)	Плазма Мембрана	другие	
Gpbp111		GPBP1L1	белок 1, подобный белку, связывающему промотер, богатый GC	Другие	другие	
Gpc3		GPC3	глипикан 3	Плазма Мембрана	другие	
Grb10		GRB10	белок 10, связывающий рецептор фактора роста	Цитоплазма	другие	
Gstm1		GSTM5	глутатион S-трансфераза mu 5	Цитоплазма	фермент	
Hap1		HAP1	хантингтин-ассоциированный белок 1	Цитоплазма	другие	
Hist1h2bc		HIST2H2BE (включает другие)	гистоновый кластер 2, H2be	Ядро	другие	
Hmga2		HMG A2	AT-крюк 2 группы с высокой подвижностью	Ядро	фермент	
Hmgn3		Hmgn3	нуклеосомный связывающий домен 3 группы с высокой подвижностью	Ядро	другие	
Hormad1		HORMAD1	белок 1, содержащий домен NORMA	Ядро	другие	
Hsd17b14		HSD17B14	гидроксистероид (17-бета) дегидрогеназа 14	Цитоплазма	фермент	
Hspb1		HSPB1	белок 1 теплового шока 27 кДа	Цитоплазма	другие	
Hspb8		HSPB8	белок 8 теплового шока 22 кДа	Цитоплазма	киназа	
Htra1		HTRA1	HtrA серинпептидаза 1	Внеклеточное пространство	пептидаза	

5	Ifi204	Ifi204 (включает другие)	ген 204 активации интерферона	Ядро	регулятор транскрип ции	
	Ifi44	IFI44	белок 44, индуцированный интерфероном	Цитоплазма	другие	
10	Ifit1	IFIT1B	белок 1B с тетратрикопептид ными повторами, индуцированный интерфероном	Цитоплазма	другие	
15	Ifitm3	IFITM2	трансмембранный белок 2, индуцированный интерфероном	Цитоплазма	другие	
20	Igf2	IGF2	инсулиноподобны й фактор роста 2 (соматомедин A)	Внеклеточное пространство	фактор роста	
25	Igfbp 7	IGFBP7	белок 7, связывающий инсулиноподобны й фактор роста	Внеклеточное пространство	транспорт ер	
	Il1r1l	IL1RL1	белок 1, подобный рецептору интерлейкина 1	Плазма Мембрана	трансмемб ранный рецептор	
30	Inhba	INHBA	ингибин, бета A	Внеклеточное пространство	фактор роста	
	Inhbb	INHBB	ингибин, бета B	Внеклеточное пространство	фактор роста	
35	Irf7	IRF7	регуляторный фактор 7 интерферона	Ядро	регулятор транскрип ции	
40	Isg15	ISG15	ISG15 убиквитиноподоб ный модификатор	Внеклеточное пространство	другие	
	Itga5	ITGA5	интегрин, альфа 5 (фибронектиновы й рецептор, альфа полипептид)	Плазма Мембрана	трансмемб ранный рецептор	
45	Jun	JUN	протоонкоген jun	Ядро	регулятор транскрип ции	

	Junb	JUNB	протоонкоген jun B	Ядро	регулятор транскрипции	
5	Lgals 3bp	LGALS3 BP	лектин, галактозид-связывающий, растворимый, связывающий белок 3	Плазма Мембрана	трансмембранный рецептор	
10	Lgals 9	LGALS9	лектин, галактозид-связывающий, растворимый, белок 9	Внеклеточное пространство	другие	
15	Lmna	LMNA	ламин A/C	Ядро	другие	
	Lox	LOX	лизилоксидаза	Внеклеточное пространство	фермент	
20	Loxl2	LOXL2	белок 2, подобный лизилоксидазе	Внеклеточное пространство	фермент	
	Loxl3	LOXL3	белок 3, подобный лизилоксидазе	Внеклеточное пространство	фермент	
25	Lrp1	LRP1	белок 1, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности	Плазма Мембрана	трансмембранный рецептор	
30	Mage b16	MAGEB 16	семейство антигена меланомы B, 16	Другие	другие	
	Mcam	MCAM	молекула адгезии меланомной клетки	Плазма Мембрана	другие	
35	Mgp	MGP	матриксный Gla-белок	Внеклеточное пространство	другие	
40	Mmp 2	MMP2	матриксная металлопептидаза 2 (желатиназа A, 72 кДа, желатиназа, 72 кДа, коллагеназа IV типа)	Внеклеточное пространство	пептидаза	маримастат
45	Mxra 8	MXRA8	белок 8, связанный с ремоделированием матрикса	Другие	другие	

5	My19	MYL9	миозин, легкая цепь 9, регуляторный белок	Цитоплазма	другие	
10	My1pf	MYLPF	легкая цепь миозина, белок phosphorylatable, быстрая скелетная мускулатура	Цитоплазма	другие	
15	Nab2	NAB2	NGFI-A-связывающий белок 2 (EGR1-связывающий белок 2)	Ядро	регулятор транскрипции	
20	Ndufb4	NDUFB4	NADH дегидрогеназа (убихинон) 1 бета субкомплекс 4, 15 кДа	Цитоплазма	транспортер	
25	Npm1	NPM1	нуклеофосмин (фосфопротеин B23 ядрышек, нуматрин)	Ядро	регулятор транскрипции	
30	Nr0b1	NR0B1	представитель 1 группы В подсемейства ядерных рецепторов 0	Ядро	лиганд-зависимый ядерный рецептор	
35	Nr4a1	NR4A1	представитель 1 группы А подсемейства ядерных рецепторов 4	Ядро	лиганд-зависимый ядерный рецептор	
40	Nrp2	NRP2	нейропилин 2	Плазма Мембрана	киназа	
45	Oasl1	OAS1	2'-5'-олигоаденилатсинтетазы 1, 40/46 кДа	Цитоплазма	фермент	
	Oasl2	Oasl2	белок 2, подобный 2'-5'-олигоаденилатсинтетазе	Другие	фермент	
	P4ha2	P4HA2	пролил 4-гидроксилаза, полипептид II альфа	Цитоплазма	фермент	

5	Parp3	PARP3	представитель 3 семейства поли (АДФ-рибоза) полимеразы	Ядро	фермент	
	Pcolce	PCOLCE	энхансер C-эндопептидазы проколлагена	Внеклеточное пространство	другие	
10	Pcyl1b	PCYT1B	фосфат цитидилилтрансфераза 1, холин, бета	Цитоплазма	фермент	
	Pdgfc	PDGFC	тромбоцитарный фактор роста C	Внеклеточное пространство	фактор роста	
15	Phlda1	PHLDA1	представитель 1 семейства А домена, подобного по гомологии плекстрину	Цитоплазма	другие	
20	Phlda2	PHLDA2	представитель 2 семейства А домена, подобного по гомологии плекстрину	Цитоплазма	другие	
25	Pla2g1b	PLA2G1B	фосфолипаза A2, группа IB (поджелудочная железа)	Внеклеточное пространство	фермент	нифлумовая кислота
30	Pla2g4a	PLA2G4A	фосфолипаза A2, группа IVA (цитозольная, кальций-зависимая)	Цитоплазма	фермент	хинакрин
35	Porcnc	PORCNC	гомолог дикобраза (дрозофила)	Цитоплазма	другие	
40	Postn	POSTN	периостин, специфический фактор остеобластов	Внеклеточное пространство	другие	
	Prrx1	PRRX1	парный связанный гомеобокс 1	Ядро	регулятор транскрипции	
45	Prss23	PRSS23	протеаза, серин, 23	Внеклеточное пространство	пептидаза	

5  
  
10  
  
15  
  
20  
  
25  
  
30  
  
35  
  
40  
  
45

Psmb8	PSMB8	белок 8 бета типа субъединицы протеасомы (просома, мультикаталитическая протеаза)	Цитоплазма	пептидаза	
Ptgs2	PTGS2	простагландин-эндопероксидсинтаза 2 (простагландин G/H синтаза и циклооксигеназа)	Цитоплазма	фермент	ацетаминофен/пентазоцин, ацетаминофен/клетемастин/псевдоэфедрин, аспирин/буталбитал/кофеин, ацетаминофен/кофеин/дигидрокодеин, аспирин/гидрокодон, аспирин/оксикодон, ацетаминофен/аспирин/кофеин, аспирин/правастатин, ацетаминофен/дексбромфенираминопсевдоэфедрин, аспирин/мепробамат, аспирин/кофеин/пропоксифен, аспирин/буталбитал/кофеин/кодеин, аспирин/кофеин/дигидрокодеин, хлорфенирамин/ибупрофен/псевдоэфедрин, ликофелон, менатетренон, икозапент, супрофен, лорноксикам, тиапрофеновая кислота, лумиракоксиб, теноксикам, напроксен/суматриптан, ибупрофен/фенилэфрин, ацетаминофен/аспирин/кодеин,

5

10

15

20

25

30

35

40

45

						<p>напроксен/эзоме          празол,          фамотидин/ибуп          рофен,          ибупрофен/фени          лэфрин/хлорфен          ирамин,          диклофенак/мизо          простол,          ацетаминофен/бу          талбитал/кофеин          ,          гидрокодон/ибуп          рофен,          ацетаминофен/ги          дрокодон,          ацетаминофен/тр          амадол,          ацетаминофен/ко          деин,          ацетаминофен/ок          сикодон,          ацетаминофен/пр          опоксифен,          нифлумовая          кислота,          нитроаспирин,          кетопрофен,          диклофенак,          эторикоксиб,          напроксен,          меклофенамовая          кислота,          помалидомид,          мелоксикам,          целекоксиб,          дипирон,          нимесулид,          ацетаминофен,          мефенамовая          кислота,          дифлунизал,          ибупрофен,          GW406381X,          фенилбутазон,          индометацин,          сульфасалазин,          пироксикам,          валдекоксиб,          аспирин,          карпрофен,          зомепирак,          рофекоксиб,          аспирин/метокар          бамол,          аспирин/кофеин/</p>
--	--	--	--	--	--	--

5

10

15

20

25

30

35

40

45

						орфенадрин, аспирин/каризопродол, аспирин/каризопродол/кодеин, ацетаминофен/буталбитал, балсалазид, аспирин/дипиридамола, ацетаминофен/буталбитал/кофеин/кодеин, рацемический флурбипрофен, фенацетин, сулиндак, набуметон, этодолак, толметин, кеторолак, оксапрозин, месаламин, салсалат, фенопрофен, салициловая кислота, ацетаминофен/хлорфенирамин/гидрокодон/фенилэфрин/кофеин, бромфенак
Ptn		PTN	плейотропин	Внеклеточное пространство	фактор роста	
Ptrf		PTRF	фактор высвобождения транскрипции и полимераза I	Ядро	регулятор транскрипции	
Rarg		RARG	рецептор ретиноевой кислоты, гамма	Ядро	лиганд-зависимый ядерный рецептор	этретинат, адапален, изотретиноин, тазаротен, ацитретин, третиноин, алитретиноин, фенретиноид
Rgs16		RGS16	регулятор сигнализации G-белка 16	Цитоплазма	другие	

	Rn45s	Rn45s	45S пре-рибосомальная РНК	Другие	другие	
5	Rpl10a	RPL10A	рибосомальный белок L10a	Другие	другие	
	Rpl31	RPL31	рибосомальный белок L31	Другие	другие	
10	Rpl37a	RPL37A	рибосомальный белок L37a	Цитоплазма	другие	
	Rps10	RPS10-NUDT3	RPS10-NUDT3, прочитывание терминатора	Цитоплазма	другие	
15	Rps14	RPS14	рибосомальный белок S14	Цитоплазма	регулятор трансляции	
	Rps20	Rps20	рибосомальный белок S20	Цитоплазма	другие	
20	Rps26	RPS26	рибосомальный белок S26	Цитоплазма	другие	
	Rps9	RPS9	рибосомальный белок S9	Цитоплазма	регулятор трансляции	
25	S100a4	S100A4	S100 кальций-связывающий белок A4	Цитоплазма	другие	
	S100a6	S100A6	S100 кальций-связывающий белок A6	Цитоплазма	транспортер	
30	Schp1	SCHIP1	белок 1, взаимодействующий со шванноминном	Цитоплазма	другие	
35	Sdc2	SDC2	синдекан 2	Плазма Мембрана	другие	
	Serpine1	SERPINE1	представитель 1 филогенетической ветви E (нексин, активатор ингибитора плазминогена типа 1), ингибитор серпинлептидазы	Внеклеточное пространство	другие	дротрекогин альфа
40	Serpine2	SERPINE2	представитель 2 филогенетической ветви E (нексин,	Внеклеточное пространство	другие	
45						

5

10

15

20

25

30

35

40

45

			активатор ингибитора плазминогена типа 1), ингибитор серпинпептидазы			
Serpinf1	SERPINF1	представитель 1 филогенетической ветви F (альфа-2 антиплазмин, фактор, полученный из пигментного эпителия), ингибитор серпинпептидазы	Внеклеточное пространство	другие		
Sh3gl2	SH3GL2	SH3-домена GRB2-подобный белок 2	Плазма Мембрана	фермент		
Slc19a2	SLC19A2	представитель 2 семейства переносчиков растворенных веществ 19 (транспортёр тиамина)	Плазма Мембрана	транспортёр		
Slc25a5	SLC25A5	представитель 5 семейства переносчиков растворенных веществ 25 (митохондриальный носитель; аденин-нуклеотидный транслокатор)	Цитоплазма	транспортёр	клодроновая кислота	
Slc29a1	SLC29A1	представитель 1 семейства переносчиков растворенных веществ 29 (транспортёр уравнивающего нуклеозид)	Плазма Мембрана	транспортёр		
Slc35f2	SLC35F2	представитель F2 семейства переносчиков растворенных веществ 35	Другие	другие		
Snrpn	SNRPN	полипептид N малого ядерного	Ядро	другие		

			рибонуклеопро теина			
5	Snx22	SNX22	сортировочный нексин 22	Другие	транспорт ер	
10	Sparc	SPARC	секретированный белок, кислый, богатый цистеином (остеонектин)	Внеклеточное пространство	другие	
	Spp1	SPP1	секретированный фосфопротеин 1	Внеклеточное пространство	цитокин	
15	Sult4a 1	SULT4A 1	представитель 1 семейства сульфотрансфераз ы 4А	Цитоплазма	фермент	
	Tagln	TAGLN	трангелин	Цитоплазма	другие	
20	Tcea3	TCEA3	белок 3 фактора удлинения транскрипции А (SII)	Ядро	регулятор транскрип ции	
25	Tgfb3	TGFB3	трансформирующ ий фактор роста, бета 3	Внеклеточное пространство	фактор роста	
	Thbs1	THBS1	тромбоспондин 1	Внеклеточное пространство	другие	
30	Thbs2	THBS2	тромбоспондин 2	Внеклеточное пространство	другие	
35	Tm4s fl	TM4SF1	представитель 1 шестого трансмембранног о семейства 4 L	Плазма Мембрана	другие	
40	Tmbi m1	TMBIM 1	белок 1, содержащий мотив трансмембранног о ингибитора ВAX	Цитоплазма	другие	
	Tme m176 b	TMEM1 76B	трансмембранный белок 176В	Другие	другие	
45	Tnc	TNC	тенасцин С	Внеклеточное пространство	другие	

5	Tpd5 2l1	TPD52L 1	белок 1, подобный опухолевому белку D52	Цитоплазма	другие	
	Tpm2	TPM2	тропомиозин 2 (бета)	Цитоплазма	другие	
10	Usp1 8	USP18	убиквитин- специфичная пептидаза 18	Цитоплазма	пептидаза	
	Vim	VIM	виментин	Цитоплазма	другие	
15	Wfdc 2	WFDC2	домен 2 четырех- дисульфидного ядра WAP	Внеклеточное пространство	другие	
	Wisp 2	WISP2	белок 2 индуцибельного сигнального пути WNT1	Внеклеточное пространство	фактор роста	
20	Ybx1	YBX1	белок 1, связывающий Y бокс	Ядро	регулятор транскрип- ции	

Таблица 13. Перечисленные гены экспрессировались на 20-кратно более высоких уровнях в крысиных ЭС клетках по сравнению с соответствующими генами в мышиных ЭС клетках.

ID	Примечания	Символ	Название гена в базе Entrez	Расположение	Тип (-ы)	Лекарственное средство (-а)
30		Ajar1	белок 1, связанный с адгезионными контактами	Другие	другие	
		Amd1	аденозилметионин декарбоксилаза 1	Цитоплазма	фермент	
35		Ankrd2	белок с анкириновым повтором 2 (мышцы, реагирующие на растяжение)	Ядро	регулятор транскрипции	
40		Arhgef9	фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена (GEF) Cdc42	Цитоплазма	другие	
45		Atp5h	АТФ синтаза, H <sup>+</sup> транспортировка, митохондриальный	Цитоплазма	фермент	

			комплекс F0, субъединица d			
5	Btg3	BTG3	представитель семейства BTG 3	Ядро	другие	
10	Car6	CA6	карбоангидраза VI	Внеклеточное пространство	фермент	метазоламид, гидрохлоротиазид, ацетазоламид, трихлорметиазид, хлоротиазид, хлорталидон, бензтиазид, сульфацетамид, топирамат
15	Camk4	CAMK4	кальций/калмодулин-зависимая протеинкиназа IV	Ядро	киназа	
	Capn12	CAPN12	калпаин 12	Другие	пептидаза	
20	Cct6b	CCT6B	TCP1, содержащий шаперонин, субъединица 6B (зета 2)	Цитоплазма	транспортер	
25	Cdx2	CDX2	гомеобокс 2 каудального типа	Ядро	регулятор транскрипции	
	Cldn5	CLDN5	клаудин 5	Плазма Мембрана	другие	
30	Clec3a	CLEC3A	представитель семейства лектинового домена C-типа 3 A	Другие	другие	
35	Clic6	CLIC6	хлоридный внутриклеточный канал 6	Плазма Мембрана	ионный канал	
40	Dhrsx	DHRSX	дегидрогеназа/редуктаза (семейство SDR) связанное с X-хромосомой	Другие	фермент	
	Dpysl2	DPYSL2	дигидропиримидин аза-подобный белок 2	Цитоплазма	фермент	
45	Dusp26	DUSP26	фосфатаза с двойной специфичностью (предполагаемая) 26	Цитоплазма	фермент	

	Eci3		Eci3	дельта изомераза 3 еноил-коэнзима А	Другие	фермент	
5	Eef2k		EEF2K	киназа эукариотического фактора удлинения 2	Цитоплазм а	киназа	
	Efna1		EFNA1	эфрин-А1	Плазма Мембрана	другие	
10	Epha4		EPHA4	EPH рецептор А4	Плазма Мембрана	киназа	
	Fank1		FANK1	повторные домены 1 фибронектина III и анкирина	Ядро	регулятор транскрипци и	
15	Fhit		FHIT	ломкая область гистидиновой триады	Цитоплазм а	фермент	
	Filip1		FILIP1	белок 1, взаимодействующ ий с филамином А	Цитоплазм а	другие	
20	Fmod		FMOD	фибромодулин	Внеклеточ ное пространс тво	другие	
25	Foxe1		FOXO1	ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2)	Ядро	регулятор транскрипци и	
30	Fry		FRY	гомолог мехового покрытия (дрозофила)	Внеклеточ ное пространс тво	другие	
35	Gjb5		GJB5	белок бета 5 межклеточных щелевых контактов, 31,1 кДа	Плазма Мембрана	транспортер	
	Gpx2		GPX2	глутатионпероксид аза 2 (желудочно- кишечная)	Цитоплазм а	фермент	
40	Grxcr2		GRXCR 2	глутаредоксин, богатый цистеином белок 2	Другие	другие	
45	Hscw2		HSCW2	белок 2 убиквитин протеинлигазы E3, содержащей домен HECT, C2 и WW	Внеклеточ ное пространс тво	фермент	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Hey2		HEY2	ген, родственный hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW	Ядро	регулятор транскрипции	
Icos		Icos	костимулятор индуцибельной Т-клетки	Плазма Мембрана	другие	
Ifitm1		IFITM1	трансмембранный белок 1, индуцированный интерфероном	Плазма Мембрана	трансмембранный рецептор	
Il1f8		интерлейкин 36 бета				
Il28ra		рецептор альфа интерлейкина 28				
Igfbpl1		IGFBPL1	белок, подобный белку 1, связывающему инсулиноподобный фактор роста	Другие	другие	
Ipcef1		IPCEF1	белок взаимодействия для фактора 1 обмена цитохезина	Цитоплазма	фермент	
Lctf1		Lctf1	белок, подобный лактазе	Цитоплазма	другие	
Ldhd		LDHD	лактатдегидрогеназа D	Цитоплазма	фермент	
Lef1		LEF1	фактор связывающий лимфоидный энхансер 1,	Ядро	регулятор транскрипции	
Lefty1		LEFTY1	фактор детерминации асимметрии 1	Внеклеточное пространство	фактор роста	
Lifr		LIFR	альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии	Плазма Мембрана	трансмембранный рецептор	

	Lpar2	LPAR2	рецептор лизофосфатидной кислоты 2	Плазма Мембрана	рецептор, связанный с G-белком	
5	Mog	MOG	гликопротеин миелина олигодендроцитов	Внеклеточ ное пространс тво	другие	
10	Morn5	MORN5	белок 5, содержащий повтор MORN	Другие	другие	
15	Pigz	NCBP2	субъединица 2 белка, связывающего ядерный рецептор sar, 20 кДа	Ядро	другие	
20	Nptxr	NPTXR	нейрональный рецептор пентраксина	Плазма Мембрана	трансмембра нный рецептор	
	Ntm	NTM	нейротримин	Плазма Мембрана	другие	
	Nutf2	NUTF2	фактор 2 ядерного транспорта	Ядро	транспортер	
25	Ocln	OCLN	occludin	Плазма Мембрана	фермент	
30	Olr1	OLR1	рецептор 1 окисленного липопротеина низкой плотности (лектиноподобный )	Плазма Мембрана	трансмембра нный рецептор	
35	Pabpc4	PABPC4	поли(A)- связывающий белок, цитоплазматический 4 (индуцибельная форма)	Цитоплазм а	регулятор трансляции	
40	Pde11a	PDE11A	фосфодиэстераза 11A	Цитоплазм а	фермент	дифиллин, нитроглицерин, аминофиллин, дипиридамола, толбутамид, тадалафил, теофиллин, пентоксифиллин
45	Pdyn	PDYN	продинорфин	Внеклеточ ное	транспортер	

				пространс тво		
5	Per3	PER3	белок 3 интервала циркадных часов	Ядро	другие	
	Plp	PLLP	плазмолипин	Плазма Мембрана	транспортер	
10	Ppp1r14 c	PPP1R14 C	протеинтирозинфо сфатаза 1, регуляторная (ингибирующая) субъединица 14C	Цитоплазм а	другие	
15	Pramel6	Pramel6	белок 6, подобный преимущественно экспрессируемому антигену меланомы	Другие	другие	
20	Ptpn18	PTPN18	протеинтирозинфо сфатаза нерецепторного типа 18 (полученная из головного мозга)	Ядро	фосфатаза	
25	Pycr1	PYCR1	пирролин-5- карбоксилат редуктаза 1	Цитоплазм а	фермент	
30	Rab26	RAB26	RAB26, представитель семейства онкогенов RAS	Плазма Мембрана	фермент	
35	Ramp2	RAMP2	белок 2, модифицирующий активность рецептора (связанного с G- белком)	Плазма Мембрана	транспортер	прампинтид
40	Rbm24	RBM24	белок 24 РНК- связывающего мотива	Другие	другие	
	Rhag	RHAG	Rh-связанный гликопротеин	Плазма Мембрана	пептидаза	
45	Rpl3	RPL3	рибосомальный белок L3	Цитоплазм а	другие	гомохаррингтон ин
	Sall3	SALL3	sal-подобный белок 3 (дрозофила)	Ядро	другие	

	Satb1		SATB1	гомеобокс 1 SATB	Ядро	регулятор транскрипции	
5	Scg2		SCG2	секретогранин II	Внеклеточное пространство	цитокин	
10	Slc15a1		SLC15A1	представитель семейства переносчиков растворенных веществ 15 (олигопептидный транспортер)	Плазма Мембрана	транспортер	
15	Slc1a1		SLC1A1	представитель семейства переносчиков растворенных веществ 1 (нейрональный/эпителиальный высокоаффинный глутаматный транспортер, система Xag)	Плазма Мембрана	транспортер	рилузол
20	Slc24a5		Slc24a5	представитель семейства переносчиков растворенных веществ 24 (обменник натрия/калия/кальция)	Другие	другие	
25	Slc37a2		SLC37A2	представитель семейства переносчиков растворенных веществ 37 (глюкозо-6-фосфатный транспортер)	Другие	транспортер	
30	40424		SNTB1	синтрофин, бета 1 (дистрофин-связанный белок A1, 59 кДа, основной компонент 1)	Плазма Мембрана	другие	
35	St6galnac3		ST6GALNAC3	ST6 (альфа-N-ацетилнейраминил-2,3-	Цитоплазма	фермент	
40							
45							

5			бета-галактозил-1,3)-N-ацетилгалактозами нид альфа-2,6-сиалиттрансфераза 3			
10	Tex12	TEX12	белок 12, экспрессируемый в яичках	Ядро	другие	
15	Tex15	TEX15	белок 15, экспрессируемый в яичках	Внеклеточное пространство	другие	
20	Tfap2a	TFAP2A	фактор транскрипции AP-2 альфа (активирующий энхансерный связывающий белок 2 альфа)	Ядро	регулятор транскрипции	
25	Tmc1	TMC1	белок 1, подобный трансмембранным каналам	Плазма Мембрана	другие	
30	Tmem130	TMEM130	трансмембранный белок 130	Другие	другие	
35	Tmem30b	TMEM30B	трансмембранный белок 30B	Другие	другие	
40	Tom20	TOMM20	гомолог транслоказы внешней митохондриальной мембраны 20 (дрожжи)	Цитоплазма	транспортер	
45	Tox3	TOX3	представитель 3 семейства бокс группы с высокой подвижностью TOX	Другие	другие	
	Ttc25	TTC25	домен 25 с повтором тетратрикопептида	Цитоплазма	другие	
	Tump	TUMP	тимидинфосфорил аза	Внеклеточное пространство	фактор роста	

	Ubb		Ubb	убиквитин В	Цитоплазма	другие	
5	Vamp7		VAMP7	мембранный белок 7, связанный с везикулой	Цитоплазма	транспортёр	
10	Wfdc12		Wfdc12	домен 12 четырех-дисульфидного ядра WAP	Внеклеточное пространство	другие	
15	Wfdc15a		Wfdc15a	домен 15А четырех-дисульфидного ядра WAP	Другие	другие	
	Wfdc6a		Wfdc6a	домен 6А четырех-дисульфидного ядра WAP	Другие	другие	

Таблица 14. Подмножество генов из Таблицы 13, которые экспрессировались на 20-кратно более высоких уровнях в крысиных ЭС клетках по сравнению с соответствующими генами в мышинных ЭС клетках.

ID	Название гена в базе Entrez
Ajar1	белок, связанный с адгезионными контактами
Cldn5	клаудин 5
Arhgef9	фактор 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42
Camk4	кальций/калмодулин-зависимая протеинкиназа IV
Efna1	эфрин-А1
Epha4	ЕРН рецептор А4
Gjb5	белок бета 5 межклеточных щелевых контактов
Igfbp1	белок, подобный белку 1, связывающему инсулиноподобный фактор роста
Il1f8	интерлейкин 36 бета

5	Il28ra	рецептор альфа интерлейкина 28
	Lefty1	фактор 1 детерминации асимметрии
	Lifr	альфа-рецептор фактора ингибирования лейкемии
10	Lpar2	рецептор 2 лизофосфатидной кислоты
	Ntm	нейрональный рецептор пентраксина
15	Ptpn18	протеинтирозинфосфатаза нерецепторного типа 18
	Cdx2	гомеобокс 2 каудального типа
20	Fank1	повторные домены 1 фибронектина III и анкирина
	Foxe1	ген forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2)
25	Hey2	ген, родственный hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW
	Lef1	фактор 1, связывающий лимфоидный энхансер
30	Sall3	ген 3, подобный Sal (дрозофила)
35	Satb1	гомеобокс 1 SATB

Также была разработана дополнительная молекулярная сигнатура с использованием маркеров/генов плюрипотентности крысиных ЭС клеток. В Таблице 15 представлен список генов и ранги их экспрессии из профилирования данных РНК. мРНК выделяли из крысиных ЭС клеток и уровень экспрессии различных маркеров плюрипотентности сравнивали друг с другом. Перечисленные «гены плюрипотентности» представляют собой гены, используемые другими группами (в основном у мыши, но также у крысы) в качестве маркеров ЭС клеток. Мезодермальный, энтодермальный и нейронный гены определяются аналогичным образом. Определение «ранг» относится к экспрессии в эксперименте, проведенном авторами изобретения: чем выше ранг (1 является самым высоким), тем выше экспрессия. Например, ранг Oct4's равный 13 означает, что из всех генов, которые анализировали, экспрессия этого гена была выше всех, кроме 12 генов. Фоновым в этом эксперименте был любой уровень экспрессии ниже 30; 6107 генов имели уровни экспрессии 30 или выше.

Таблица 15. Молекулярная сигнатура крысиной ЭС клетки включает маркеры/гены плюрипотентности, мезодермальные, энтодермальные, нейронные и трофктодермальные маркеры/гены.

	Плюрипотентность	Ранг плюрипотенности	Мезодермальный	Мезодермальный ранг	Энтодермальный ранг	Энтодермальный ранг	Нейронный ранг	Нейронный ранг	Трофктодермальный ранг	Трофктодермальный ранг
5	c-Мyc	8248	Brachyury	7542	Gata6	11195	Nestin	7761	Cdx2	739
10	Dnmt3L	127	Flk1	?	Sox17	11418	Rax6	13570		
	Dppa2	Не тестировали	Nodal	3050	Hhex1	4571	Sox2	681		
	Dppa5	Не тестировали	Vmp4	3072	Nodal	3050				
15	Ecat1	9714	Vmp2	6382	Ext1	6091				
	Eras	2541			Sox7	10284				
	Err-beta	1368								
	Fbxo15	1369								
	Fgf4	3440								
20	Fthl17	Не тестировали								
	Gdf3	2771	Ранг > 6107 = фоновая экспрессия							
	Klf4	836								
25	Lef1	1313								
	LIF-рецептор	724								
	Lin28	828								
	Nanog	774								
30	Oct4	13								
	Rexo1	6119								
	Sox15	4524								
	Sox2	681								
35	SSEA1	Не тестировали								
	SSEA4	Не тестировали								
40	Stella	Не тестировали								
	Tcl1	Не тестировали								
45	Utf1	1501								

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, указывают на уровень специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. Все публикации и патентные заявки включены в настоящее описание посредством

ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и индивидуально указана как включенная посредством ссылки. Если иное не очевидно из контекста, любой вариант реализации изобретения, аспект, стадия или особенность настоящего изобретения могут быть использованы в сочетании с любыми другими. Ссылка на диапазон включает любые целые числа в пределах диапазона, любой поддиапазон в пределах диапазона. Ссылка на множество диапазонов включает в себя композицию таких диапазонов.

Перечень последовательностей

<110> Lee, Jeffrey D.  
 10 Auerbach, Wojtek  
 Heslin, David  
 Frendewey, David  
 Lai, Ka-Man Venus  
 Valenzuela, David M.

15 <120> Генетическая модификация крыс  
 <130> 057766/441914  
 <150> US 61/767,093  
 <151> 2013-02-20  
 <160> 1

20 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
 <210> 1  
 <211> 203  
 <212> ФРТ  
 <213> Mus Musculus

25 <400> 1  
 Met Lys Val Leu Ala Ala Gly Ile Val Pro Leu Leu Leu Leu Val Leu  
 1 5 10 15  
 His Trp Lys His Gly Ala Gly Ser Pro Leu Pro Ile Thr Pro Val Asn  
 20 25 30  
 30 Ala Thr Cys Ala Ile Arg His Pro Cys His Gly Asn Leu Met Asn Gln  
 35 40 45  
 Ile Lys Asn Gln Leu Ala Gln Leu Asn Gly Ser Ala Asn Ala Leu Phe  
 50 55 60  
 Ile Ser Tyr Tyr Thr Ala Gln Gly Glu Pro Phe Pro Asn Asn Val Glu  
 35 65 70 75 80  
 Lys Leu Cys Ala Pro Asn Met Thr Asp Phe Pro Ser Phe His Gly Asn  
 85 90 95  
 Gly Thr Glu Lys Thr Lys Leu Val Glu Leu Tyr Arg Met Val Ala Tyr  
 100 105 110  
 40 Leu Ser Ala Ser Leu Thr Asn Ile Thr Arg Asp Gln Lys Val Leu Asn  
 115 120 125  
 Pro Thr Ala Val Ser Leu Gln Val Lys Leu Asn Ala Thr Ile Asp Val  
 130 135 140  
 Met Arg Gly Leu Leu Ser Asn Val Leu Cys Arg Leu Cys Asn Lys Tyr  
 45 145 150 155 160  
 Arg Val Gly His Val Asp Val Pro Pro Val Pro Asp His Ser Asp Lys  
 165 170 175  
 Glu Ala Phe Gln Arg Lys Lys Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Thr Tyr

	180	185	190
Lys	Gln Val Ile Ser Val Val Val	Gln Ala Phe	
	195	200	

## (57) Формула изобретения

1. Композиция для культивирования и поддержания плюрипотентности крысиной эмбриональной стволовой (ЭС) клетки, содержащая:

(а) фидерный клеточный слой, не модифицированный для экспрессии фактора ингибирования лейкемии (LIF);

(b) среду, которая поддерживает плюрипотентность крысиных ЭС клеток и содержит от около 50 Ед/мл до около 150 Ед/мл LIF и комбинацию ингибиторов, состоящую из ингибитора MEK и ингибитора GSK3; и

(с) популяцию из одной или более крысиных ЭС клеток, причем крысиные ЭС клетки содержат целевую генетическую модификацию и способны передавать целевую генетическую модификацию через зародышевую линию.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что фидерный клеточный слой содержит монослой митотически инактивированных мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ).

3. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что среда содержит от около 75 Ед/мл до около 125 Ед/мл LIF, необязательно причем среда содержит от около 90 Ед/мл до около 110 Ед/мл LIF.

4. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что среда содержит около 100 Ед/мл LIF.

5. Композиция по любому из пп. 1, 2 и 4, отличающаяся тем, что LIF в среде является мышечным LIF или имеет по меньшей мере 91% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и активность LIF.

6. Композиция по любому из пп. 1, 2 и 4, отличающаяся тем, что ингибитор MEK представляет собой PD0325901 и/или что ингибитор GSK3 представляет собой CHIR99021.

7. Композиция по п. 6, отличающаяся тем, что ингибитор MEK представляет собой PD0325901 в концентрации от 0,8 мкМ до около 1,2 мкМ, а ингибитор GSK3 представляет собой CHIR99021 в концентрации от около 2,5 мкМ до около 3 мкМ или от 3 мкМ до около 3,5 мкМ,

необязательно причем концентрация ингибитора MEK составляет около 1 мкМ, а концентрация ингибитора GSK3 составляет около 3 мкМ.

8. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что концентрация LIF в среде составляет около 100 Ед/мл, ингибитор MEK представляет собой PD0325901 в концентрации около 1 мкМ, а ингибитор GSK3 представляет собой CHIR99021 в концентрации около 3 мкМ.

9. Композиция по любому из пп. 1, 2, 4, 7 и 8, отличающаяся тем, что среда дополнительно содержит базовую среду DMEM/F12 и среду Neurobasal.

10. Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что среда содержит: 1x базовой среды DMEM/F12; 1x среды Neurobasal; 1% пенициллина/стрептомицина; 4 мМ L-глутамин; 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола; 1x добавки N2; 1x добавки B27, 100 Ед/мл LIF, 1 мкМ PD0325901 и 3 мкМ CHIR99021.

11. Композиция по любому из пп. 1, 2, 4, 7, 8 и 10, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки:

(i) экспрессируют маркеры плюрипотентности и демонстрируют нормальный кариотип 42X,Y; и/или

(ii) образуют в культуре сфероподобные колонии.

12. Композиция по любому из пп. 1, 2, 4, 7, 8 и 10, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация представляет собой инсерцию, делецию, нокаут, нокин, точечную мутацию или их комбинацию.

13. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что целевая генетическая модификация представляет собой инсерцию гетерологичного полинуклеотида в геном крысиных ЭС клеток.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что гетерологичный полинуклеотид содержит селективный маркер и причем селективный маркер имеет одну или более из следующих характеристик:

- (a) селективный маркер содержит неослабленный ген селективного маркера, функционально связанный с промотором;
- (b) селективный маркер имеет повышенную активность по сравнению с селективным маркером дикого типа; и
- (c) крысиные ЭС клетки содержат множество копий селективного маркера, введенных в геном.

15. Композиция по любому из пп. 1, 2, 4, 7, 8, 10, 13 и 14, отличающаяся тем, что:

- (a) крысиные ЭС клетки получены от крысы линии ACI или получены от крысы линии Dark Agouti (DA); и/или
- (b) крысиные ЭС клетки получены от эмбриона на стадии морулы или на стадии бластоцисты.

16. Композиция по любому из пп. 1, 2, 4, 7, 8, 10, 13 и 14, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки представляют собой мужские (XY) крысиные ЭС клетки или женские (XX) крысиные ЭС клетки.

17. Композиция по любому из пп. 1, 2, 4, 7, 8, 10, 13 и 14, отличающаяся тем, что крысиные ЭС клетки имеют одну или более из следующих характеристик:

- (a) крысиные ЭС клетки экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности, выбранный из Dnmt3L, Eras, Err-бета, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF-рецептора, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2 и Utf1;
- (b) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более маркеров плюрипатентности, выбранных из c-Myc, Ecat1 и Rexo1;
- (c) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более мезодермальных маркеров, выбранных из Brachyury и Vmpr2;
- (d) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более эндодермальных маркеров, выбранных из Gata6, Sox17 и Sox7;
- (e) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более нейронных маркеров, выбранных из Nestin и Pax6;
- (f) крысиные ЭС клетки экспрессируют один или более маркеров плюрипотентности, выбранных из Oct-4, Sox2 и щелочной фосфатазы; и
- (g) крысиные ЭС клетки экспрессируют один или более крысиных ЭСК-специфических генов, выбранных из белка 1, связанного с адгезионными контактами (Ajar1), клаудина 5 (Cldn5), фактора 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы IV (Camk4), эфрина-A1 (Efnal), EPH рецептора A4 (Epha4), белка бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белка 1, подобного белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкина 36 бета (Il1f8), рецептора альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактора 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептора фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептора 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейронального рецептора пентраксина (Ntm), протеинтирозинфосфатазы нерцепторного типа 18 (Rtpn18), гомеобокса 2 каудального

типа (Cdx2), повторных доменов 1 фибронектина III и анкирина (Fankl), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxel), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxel), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактора 1, связывающего лимфоидный энхансер (Lef1), гена 3, подобного Sa1 (дрозофила) (Sa113), гомеобокса 1 SATB (Satb1) и miR-632.

18. Способ получения целевой генетической модификации в крысиных эмбриональных стволовых (ЭС) клетках, включающий:

(а) культивирование популяции крысиных ЭС клеток в условиях, включающих слой фидерных клеток, которые не модифицированы для экспрессии фактора ингибирования лейкемии (LIF), и среду, которая поддерживает плюрипотентность крысиных ЭС клеток и содержит от около 50 Ед/мл до около 150 Ед/мл LIF и комбинацию ингибиторов, состоящую из ингибитора MEK и ингибитора GSK3; и

(б) модификацию крысиных ЭС клеток для содержания целевой генетической модификации, при этом крысиные ЭС клетки способны передавать целевую генетическую модификацию через зародышевую линию.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что фидерный клеточный слой содержит монослой митотически инактивированных мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ).

20. Способ по п. 18 или 19, отличающийся тем, что среда содержит от около 75 Ед/мл до около 125 Ед/мл LIF, необязательно причем среда содержит от около 90 Ед/мл до около 110 Ед/мл LIF.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что среда содержит около 100 Ед/мл LIF.

22. Способ по любому из пп. 18, 19 и 21, отличающийся тем, что LIF в среде является мышечным LIF или имеет по меньшей мере 91% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и активность LFF.

23. Способ по любому из пп. 18, 19 и 21, отличающийся тем, что ингибитор MEK представляет собой PD0325901 и/или что ингибитор GSK3 представляет собой CHIR99021.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что ингибитор MEK представляет собой PD0325901 в концентрации от 0,8 мкМ до около 1,2 мкМ, а ингибитор GSK3 представляет собой CHIR99021 в концентрации от около 2,5 мкМ до около 3 мкМ или от 3 мкМ до около 3,5 мкМ,

необязательно причем концентрация ингибитора MEK составляет около 1 мкМ, а концентрация ингибитора GSK3 составляет около 3 мкМ.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что концентрация LIF в среде составляет около 100 Ед/мл, ингибитор MEK представляет собой PD0325901 в концентрации около 1 мкМ, а ингибитор GSK3 представляет собой CHIR99021 в концентрации около 3 мкМ.

26. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24 и 25, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит базовую среду DMEM/F12 и среду Neurobasal.

27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что среда содержит: 1x базовой среды DMEM/F12; 1x среды Neurobasal; 1% пенициллина/стрептомицина; 4 мМ L-глутамин; 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола; 1x добавки N2; 1x добавки B27, 100 Ед/мл LIF, 1 мкМ PD0325901 и 3 мкМ CHIR99021.

28. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25 и 27, отличающийся тем, что крысиные ЭС клетки:

(i) экспрессируют маркеры плюрипотентности и демонстрируют нормальный кариотип 42X,Y; и/или

(ii) образуют в культуре сфероподобные колонии.

29. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25 и 27, отличающийся тем, что целевая генетическая модификация представляет собой инсерцию, делецию, нокаут, нокин, точечную мутацию или их комбинацию.

5 30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что целевая генетическая модификация представляет собой инсерцию гетерологичного полинуклеотида в геном крысиных ЭС клеток.

31. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27 и 30, отличающийся тем, что стадия модификации включает:

10 (i) введение в крысиные ЭС клетки гетерологичного полинуклеотида, содержащего селективный маркер, функционально связанный с промотором, активным в крысиных ЭС клетках; и

(ii) культивирование *in vitro* крысиных ЭС клеток попеременно в первой и второй культуральной среде, причем первая культуральная среда содержит эффективное количество селективного агента в течение первого периода времени, а вторая культуральная среда не содержит селективного агента, и причем условия культивирования *in vitro* являются достаточными для сохранения плюрипотентности, тем самым обеспечивая отбор крысиных ЭС клеток, имеющих стабильно включенный в геном гетерологичный полинуклеотид.

20 32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что чередование первой и второй культуральной среды проводят каждые 24 часа и причем селективный маркер придает устойчивость к антибиотику,

необязательно причем селективный маркер представляет собой одно или более из неоминифосфотрансферазы ( $neo^r$ ), гигромицин-В фосфотрансферазы ( $hyg^r$ ), пурамицин-  
25 N-ацетилтрансферазы ( $puro^r$ ) и бластицидин-S дезаминазы ( $bsr^r$ ); и  
необязательно причем антибиотик представляет собой G418.

33. Способ по п. 31, отличающийся тем, что селективный маркер имеет одну или более из следующих характеристик:

30 (a) селективный маркер содержит неослабленный ген селективного маркера, функционально связанный с промотором;

(b) селективный маркер имеет повышенную активность по сравнению с селективным маркером дикого типа; и

(c) крысиные ЭС клетки содержат множество копий селективного маркера, введенных  
35 в геном.

34. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32 и 33, отличающийся тем, что стадия модификации включает модификацию крысиных ЭС клеток так, чтобы они содержали две или более целевые модификации, при этом крысиные ЭС клетки могли передавать две или более целевые генетические модификации через зародышевую линию.

40 35. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32 и 33, отличающийся тем, что стадия модификации включает один или более циклов электропорации.

36. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32 и 33, отличающийся тем, что целевую генетическую модификацию создают посредством события гомологичной рекомбинации.

45 37. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32 и 33, отличающийся тем, что целевую генетическую модификацию создают с использованием нацеленного вектора, содержащего расположенные выше и ниже группы гомологий, которые фланкируют вставку полинуклеотида, причем группы гомологий соответствуют областям генома в целевом геномном локусе.

38. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32 и 33, отличающийся тем, что целевую генетическую модификацию создают с использованием нуклеазных агентов, которые создают разрыв одиночной или двойной цепи в целевом геномном локусе.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что нуклеазный агент представляет собой эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), нуклеазу белкового домена «цинковые пальцы» (ZFN), мегануклеазу или систему CRISPR/Cas.

40. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32, 33 и 39, отличающийся тем, что:

(a) крысиные ЭС клетки получены от крысы линии ACI или получены от крысы линии Dark Agouti (DA); и/или

(b) крысиные ЭС клетки получены от эмбриона на стадии морулы или на стадии бластоцисты.

41. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32, 33 и 39, отличающийся тем, что крысиные ЭС клетки представляют собой мужские (XY) крысиные ЭС клетки или женские (XX) крысиные ЭС клетки.

42. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32, 33 и 39, отличающийся тем, что крысиные ЭС клетки имеют одну или более из следующих характеристик:

(a) крысиные ЭС клетки экспрессируют по меньшей мере один маркер плюрипотентности, выбранный из Dnmt3L, Eras, Err-бета, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF-рецептора, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2 и Utf1;

(b) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более маркеров плюрипатентности, выбранных из c-Myc, Ecat1 и Rexo1;

(c) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более мезодермальных маркеров, выбранных из Brachyury и Vmpr2;

(d) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более эндодермальных маркеров, выбранных из Gata6, Sox17 и Sox7;

(e) крысиные ЭС клетки не экспрессируют один или более нейронных маркеров, выбранных из Nestin и Pax6;

(f) крысиные ЭС клетки экспрессируют один или более маркеров плюрипотентности, выбранных из Oct-4, Sox2 и щелочной фосфатазы; и

(g) крысиные ЭС клетки экспрессируют один или более крысиных ЭСК-специфических генов, выбранных из белка 1, связанного с адгезионными контактами (Ajar1), клаудина 5 (Cldn5), фактора 9 гуанин-нуклеотидного обмена Cdc42 (Arhgef9), кальций/калмодулин-зависимой протеинкиназы IV (Camk4), эфрина-A1 (Efha1), EPH рецептора A4 (Epha4), белка бета 5 межклеточных щелевых контактов (Gjb5), белка 1, подобного белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (Igfbp1), интерлейкина 36 бета (Il1f8), рецептора альфа интерлейкина 28 (Il28ra), фактора 1 детерминации асимметрии (Lefty1), альфа-рецептора фактора ингибирования лейкемии (Lifr), рецептора 2 лизофосфатидной кислоты (Lpar2), нейронального рецептора пентраксина (Ntm),

протеинтирозинфосфатазы нерцепторного типа 18 (Ptpn18), гомеобокса 2 каудального типа (Cdx2), повторных доменов 1 фибронектина III и анкирина (Fank1), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), гена forkhead box E1 (тироидный фактор транскрипции 2) (Foxe1), гена, родственного hairy/enhancer-of-split с мотивом 2 YRPW (Hey2), фактора 1, связывающего лимфоидный энхансер (Lef1), гена 3, подобного Sal (дрозофила) (Sal13), гомеобокса 1 SATB (Satb1) и miR-632.

43. Способ по любому из пп. 18, 19, 21, 24, 25, 27, 30, 32, 33 и 39, дополнительно включающий:

(e) введение по меньшей мере одной из модифицированных крысиных ЭС клеток со стадии (d) в крысиный эмбрион-хозяин для получения эмбриона F0;

(f) имплантацию эмбриона F0 суррогатной матери;

(g) созревание эмбриона F0 в организме суррогатной матери до срока; и

5 (h) идентификацию крысы F0, имеющей целевую генетическую модификацию.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что модифицированная крысиная ЭС клетка, введенная в крысиный эмбрион-хозяин, получена из той же линии крыс, что и крысиный эмбрион-хозяин.

45. Способ по п. 43, отличающийся тем, что модифицированная крысиная ЭС клетка, 10 введенная в крысиный эмбрион-хозяин, получена из линии крыс, отличной от той, к которой принадлежит крысиный эмбрион-хозяин.

46. Способ по п. 43, дополнительно включающий:

(i) скрещивание самца F0, содержащего целевую генетическую модификацию, с самкой крысы дикого типа с получением потомства F1, являющегося гетерозиготным по 15 целевой генетической модификации; и необязательно

(j) скрещивание самца крысы потомства F1 с самкой крысы потомства F1 с получением потомства F2, являющегося гомозиготным по целевой генетической модификации.

47. Способ по п. 43, отличающийся тем, что по меньшей мере 3% крыс F0, имеющих 20 целевую генетическую модификацию, передают эту целевую генетическую модификацию потомству F1,

необязательно причем по меньшей мере 10% крыс F0, имеющих целевую генетическую модификацию, передают эту целевую генетическую модификацию потомству F1, и

25 необязательно причем по меньшей мере 60% крыс F0, имеющих целевую генетическую модификацию, передают эту генетическую модификацию потомству F1.

30

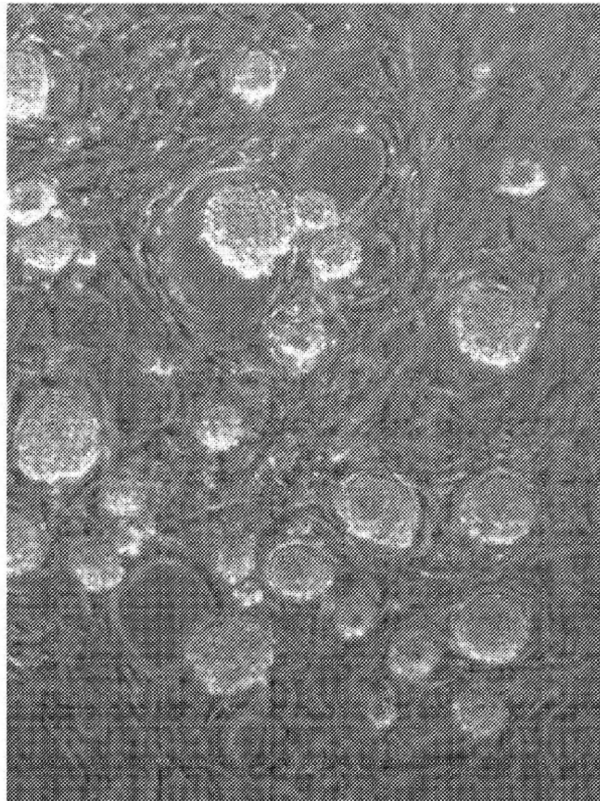
35

40

45

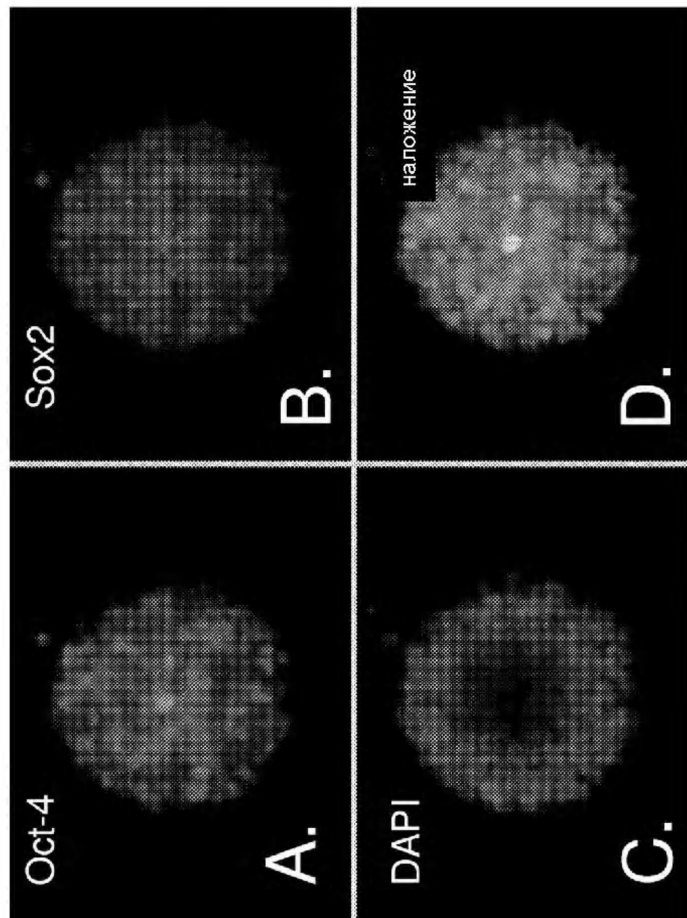
1

1/21

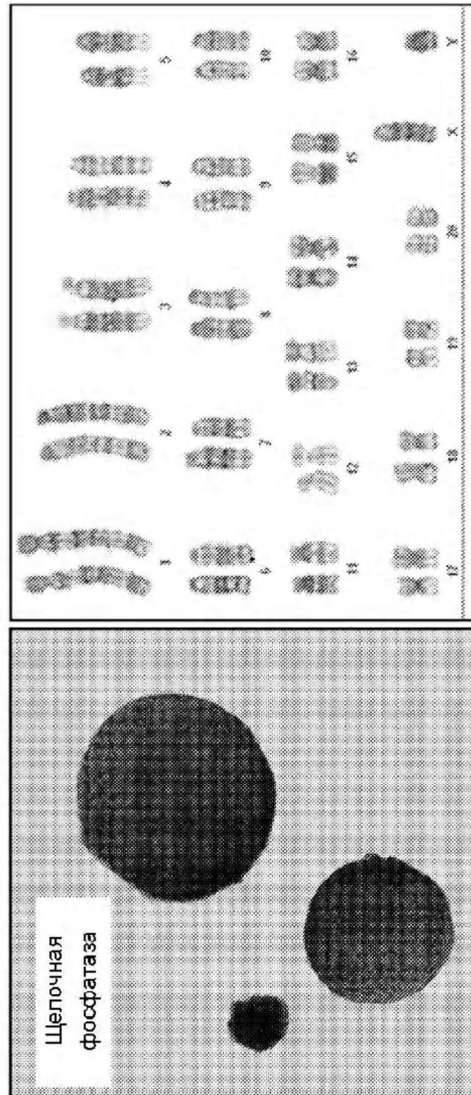


Фиг. 1

2

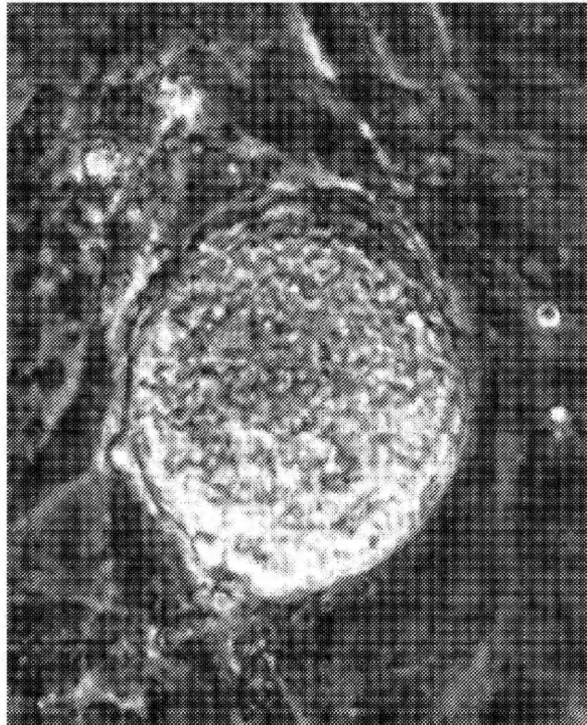


ФИГ. 2

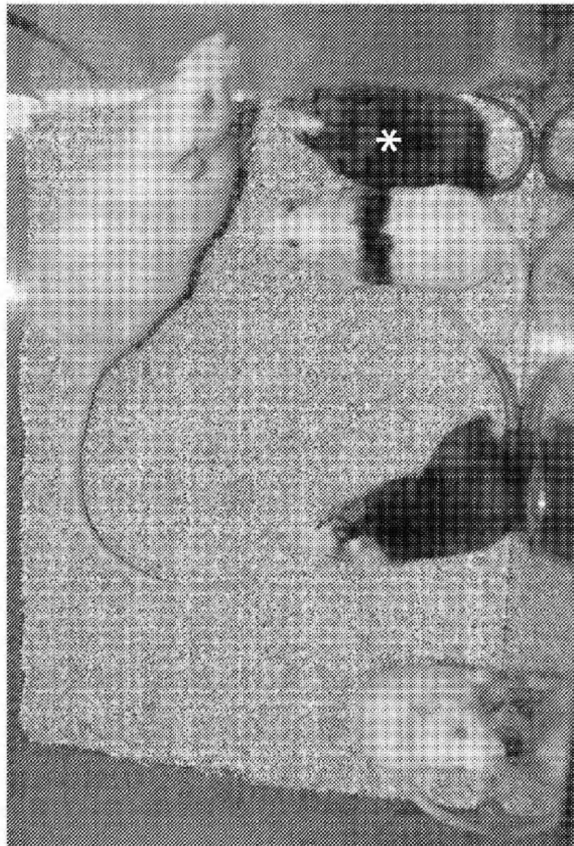


ФИГ. 3

4/21



ФИГ. 4



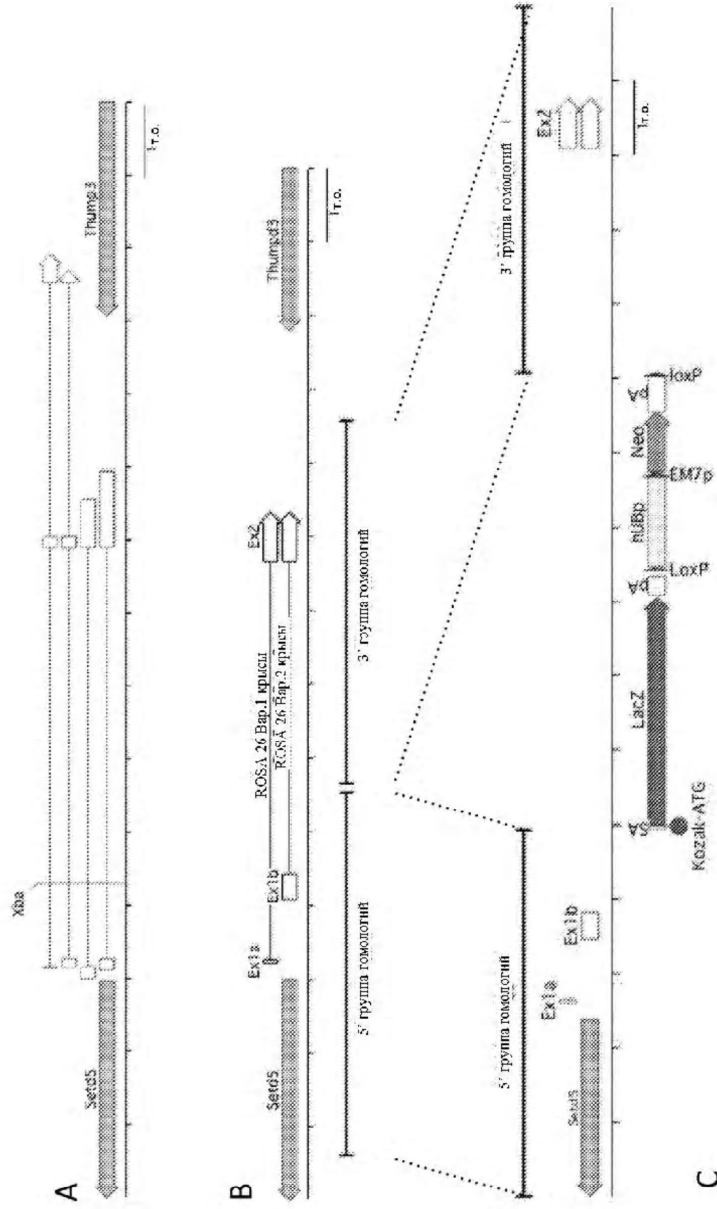
ФИГ. 5

6/21

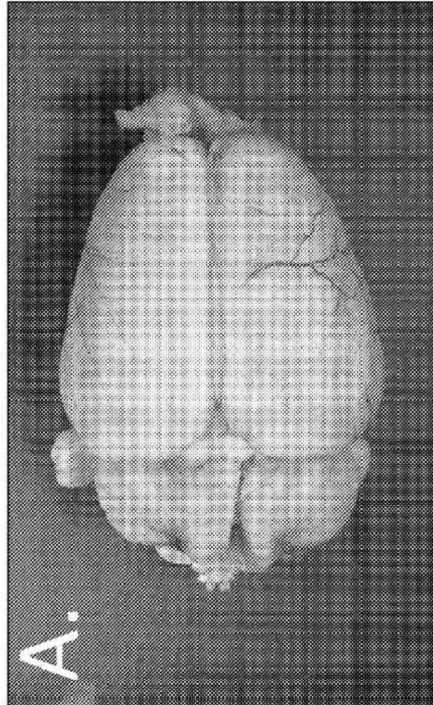


ФИГ. 6

7/21

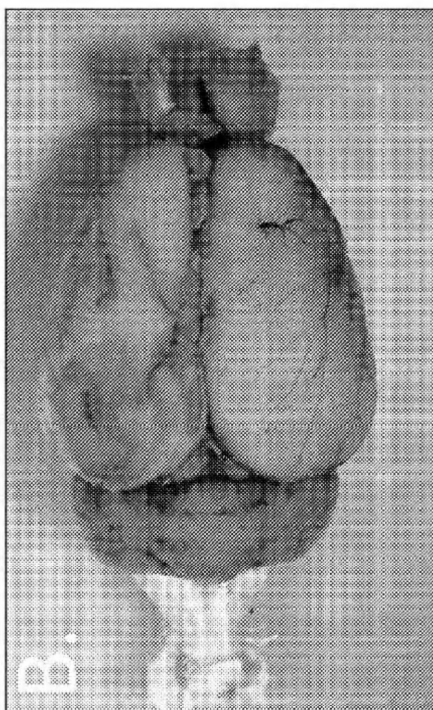


ФИГ. 7



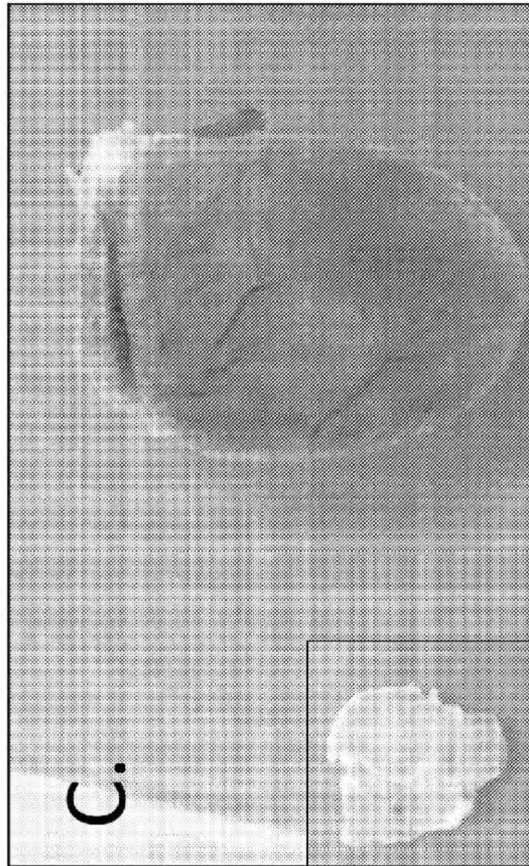
ФИГ. 8А

9/21



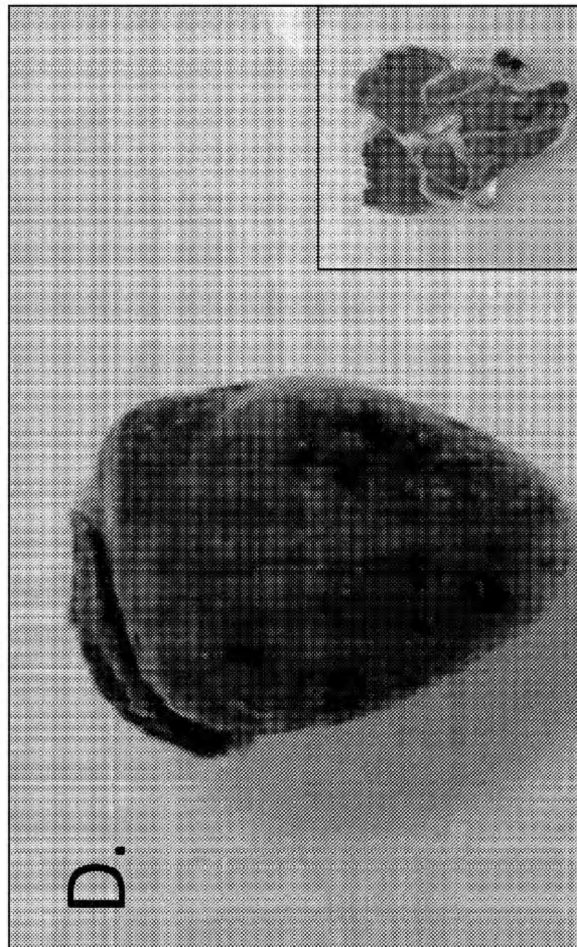
ФИГ. 8В

10/21



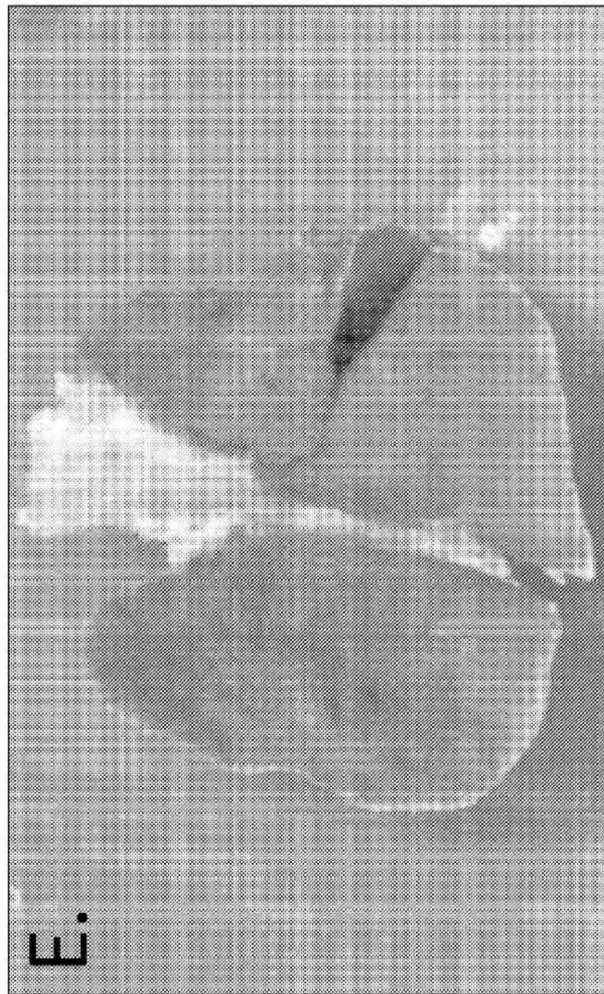
ФИГ. 8С

11/21



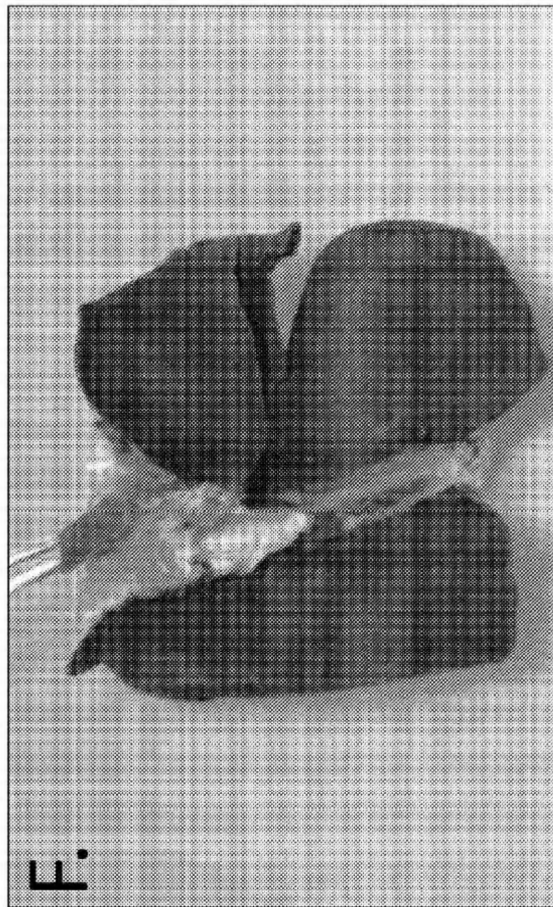
ФИГ. 8D

12/21



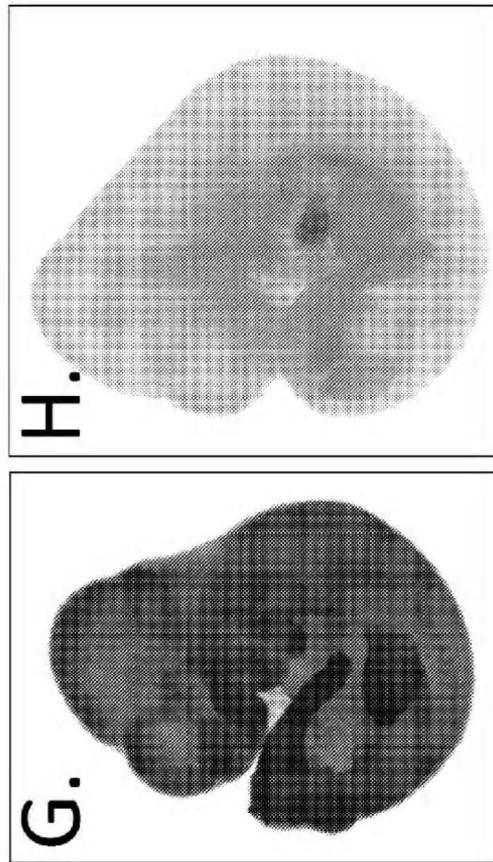
ФИГ. 8Е

13/21



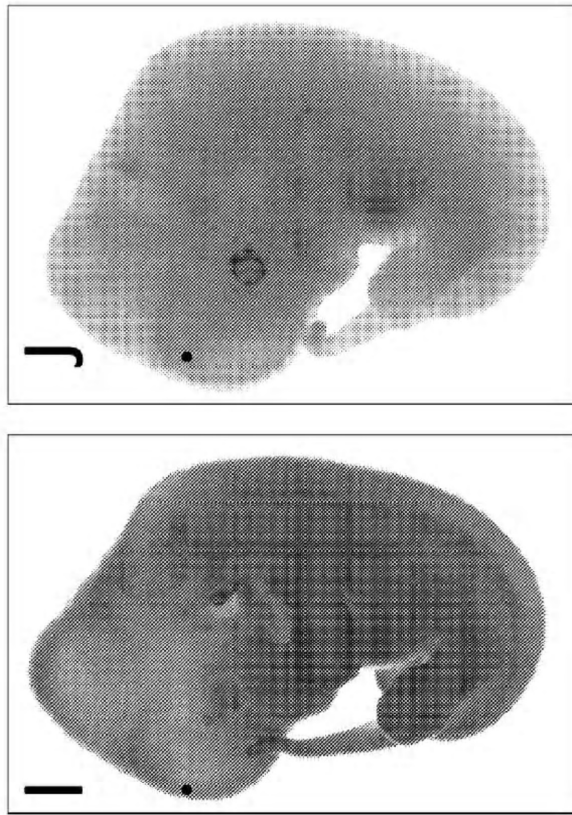
ФИГ. 8F

14/21



ФИГ. 8G,H

15/21



ФИГ. 8I, J

16/21

Клеточные результаты: 42.XY

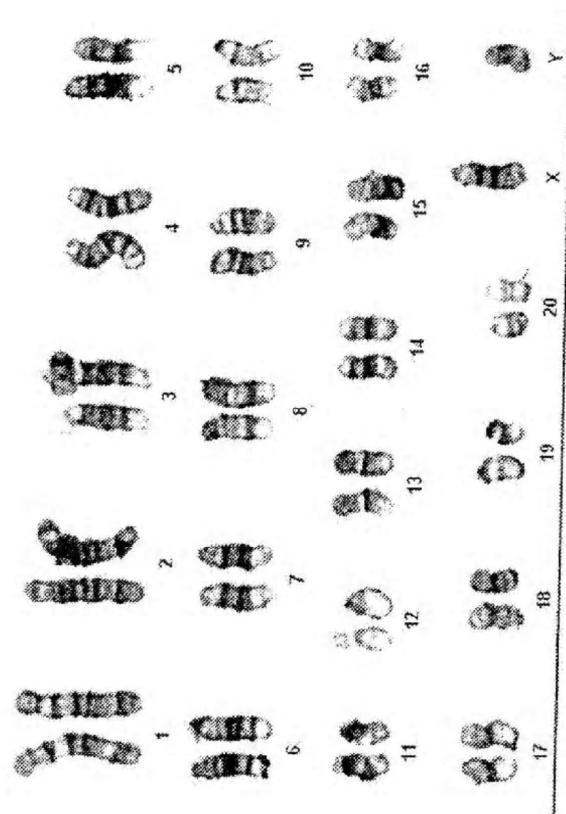


Этикетка- препарат/клетка *met-1 - S01-01*

X, Y:

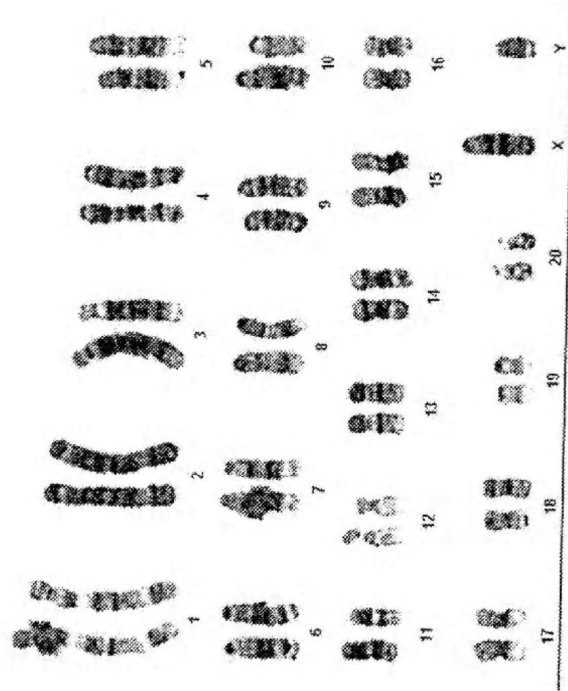
ФИГ. 9А

17/21



X, Y:  
ФИГ. 9В

18/21

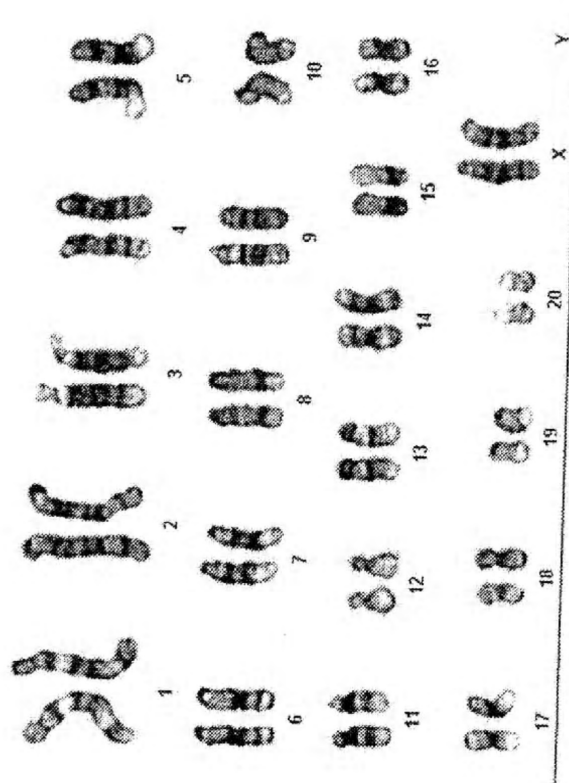


Х. Y:  
ФИГ. 10А



X, Y:  
Фиг. 10В

20/21



X, Y:  
ФИГ. 11А



X, Y:  
Фиг. 11В