РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2012 107 634** (13) **A**

(51) МПК
C12N 15/90 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: **2012107634/10, 20.09.2010**

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
18.09.2009 US 61/243,950

(43) Дата публикации заявки: **27.10.2013** Бюл. № **30**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **18.04.2012**

(86) Заявка PCT:
IB 2010/002337 (20.09.2010)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2011/033375 (24.03.2011)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, BOX-1125, ПАТЕНТИКА

(71) Заявитель(и):
СЕЛЕКСИС С.А. (CH)

(72) Автор(ы):
МЕРМО Николас (CH),
ЖИРО Пьер-Ален (CH),
ГРАНЖАН Мелани (CH),
ЛЯ ФОРН Валери (CH),
КАЛАБРЕС Давид (CH),
РЕГАМИ Александр (CH)

(54) СПОСОБЫ И ПРОДУКТЫ ДЛЯ УВЕЛИЧЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ И ПРОЦЕССИНГА ТРАНСГЕНА

(57) Формула изобретения

1. Способ экспрессии трансгена, включающий:

(а) обеспечение эукариотической клетки хозяина, предпочтительно клетки млекопитающего, причем указанную клетку-хозяина модифицируют и/или обрабатывают для увеличения гомологичной рекомбинации (HR), уменьшения негомологичного соединения концов (NHEJ) и/или увеличения соотношения HR/NHEJ в указанной клетке, и

(б) трансфекцию указанной клетки, по меньшей мере одним вектором, содержащим указанный трансген, и элементом участка прикрепления к матриксу (MAR), при этом указанный элемент MAR обеспечивают в цис- или трансположении по отношению к указанному трансгену.

2. Способ по п.1, согласно которому трансфекция на стадии (б) представляет собой последующую трансфекцию, которой предшествует начальная трансфекция нуклеиновой кислотой, такой как вектор или фрагменты нуклеиновой кислоты.

3. Способ по п.2, согласно которому указанные начальная и последующая трансфекции происходят в то время, когда более 30% клеток популяции находится в фазе G1.

4. Способ по п.2, согласно которому нуклеиновая кислота для проведения указанной начальной трансфекции представляет собой по меньшей мере один вектор, содержащий трансген, и согласно которому по меньшей мере один из указанных векторов для

RU 2012107634 A

RU 2012107634 A

начальной трансфекции и по меньшей мере один вектор для указанной по меньшей мере одной последующей трансфекции образуют одну или более конкатемерных структур перед и/или после интеграции в геном указанной клетки.

5. Способ по п.1, согласно которому соотношение HR/NHEJ в указанной клетке в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 раз больше соотношения; присутствующего в клетке, которая не содержит указанную трансгенную последовательность и не имеет мутацию, соответственно, или согласно которому активность NHEJ равна 0.

6. Способ по п.2, согласно которому указанная по меньшей мере одна начальная трансфекция представляет собой одиночную трансфекцию.

7. Способ по п.2, согласно которому указанная по меньшей мере одна последующая трансфекция представляет собой одиночную трансфекцию.

8. Способ по п.1, согласно которому указанный трансген встраивается в геном указанной клетки в виде конкатемерной структуры в единственный локус.

9. Способ по п.2, согласно которому последовательность указанного вектора для указанной по меньшей мере одной начальной трансфекции на 100% или по меньшей мере на 95%, 90%, 85% или 80% идентична последовательности по меньшей мере вектора первой из последующих трансфекции.

10. Способ по п.2, согласно которому вектор для указанной начальной трансфекции содержит MAR элемент, и последовательность указанного MAR элемента на 100% или по меньшей мере на 95%, 90%, 85% или 80% идентична последовательности MAR элемента по меньшей мере указанного вектора для первой из указанных последующих трансфекций.

11. Способ по п.2, согласно которому вектор для указанной начальной трансфекции содержит трансген, и последовательность указанного трансгена на 100% или по меньшей мере на 95%, 90%, 85% или 80% идентична последовательности трансгена по меньшей мере указанного вектора для первой из последующих трансфекций.

12. Способ по п.1, согласно которому MAR элемент расположен выше по направлению транскрипции относительно последовательности промотора/энхансера указанного трансгена.

13. Способ по п.1, последовательность MAR элемента по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1-3 или представляет собой их вариант.

14. Рекомбинантная эукариотическая клетка-хозяин, предпочтительно, клетка млекопитающего, содержащая

(а) трансгенную последовательность, экспрессирующую супрессор NHEJ, например, NU7026 и/или вортманнин,

(б) трансгенную последовательность, экспрессирующую один или более ферментов HR, например, Rad 51, Rad 52, RecA, Rad 54, RuvC или BRCA2, или активаторы HR, например, RS-1,

(в) мутацию, инактивирующую или подавляющую ген NHEJ, например, мутацию в гене xrcc4, гене трансферазы цепи RAD51, ген ДНК-зависимой протеинкиназы, гене Rad 52, гене RecA, гене Rad 54, гене RuvC и/или гене BRCA2, и/или

(г) мутацию, повышающую экспрессию или активность фермента HR, активатора HR или супрессора NHEJ, например, мутацию в гене xrcc4, гене трансферазы цепи RAD51, ген ДНК-зависимой протеинкиназы, гене Rad 52, гене RecA, гене Rad 54, гене RuvC и/или гене BRCA2, и трансген, интегрированный в геном указанной клетки,

причем указанная рекомбинантная эукариотическая клетка-хозяин имеет соотношение HR/NHEJ более чем в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 раз выше, чем соотношение в клетке, которая не содержит указанную трансгенную последовательность (а) и/или (б), и

содержит элемент участка прикрепления к матриксу (MAR)

RU 2012107634 A

RU 2012107634 A

15. Клетка по п.14, отличающаяся тем, что указанный трансген интегрирован в локус генома клетки и образует конкатемерную структуру, предпочтительно конкатемерную структуру, которая содержит по меньшей мере 200, 300, 400, 500 или 600 копий трансгена.

16. Клетка по п.14, отличающаяся тем, что последовательность указанного по меньшей мере одного MAR элемента по меньшей мере на идентична 90% SEQ ID NO: 1-3, или представляет собой вариант SEQ ID NO: 1-3.

17. Клетка по п.14, отличающаяся тем, что указанный MAR элемент расположен выше по направлению транскрипции относительно последовательности промотора/ энхансера указанного трансгена.

18. Применение рекомбинантной эукариотической клетки-хозяина по любому из п.п.14-17 для экспрессии указанного трансгена.

19. Набор, содержащий

(а) в первом контейнере вектор, возможно содержащий MAR элемент и сайты рестрикции для интеграции трансгена в указанный вектор,

(б) во втором контейнере рекомбинантную эукариотическую клетку-хозяина по любому из п.п.15-17, и

(в) инструкции по применению указанного вектора при трансфекции указанной клетки для экспрессии трансгена.

RU 2012107634 A

RU 2012107634 A