

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090585 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.08(22) Дата подачи заявки
2018.09.17(51) Int. Cl. A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/0735 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(54) ПТИЦЫ С ОТРЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ

(31) 62/560,218

(32) 2017.09.19

(33) US

(86) PCT/IL2018/051056

(87) WO 2019/058376 2019.03.28

(71) Заявитель:

ДЗЕ СТЭЙТ ОФ ИСРАЭЛЬ,
МИНИСТРИ ОФ ЭГРИКАЛЧУР
ЭНД РУРАЛ ДЕВЕЛОПМЕНТ,
ЭГРИКАЛЧУРАЛ РЕСЕРЧ
ОРГАНИЗЭЙШН (АРО) (ВОЛКАНИ
СЕНТЕР) (IL)

(72) Изобретатель:

Синнамон Йювал, Бен-Тал Сохен
Энбал (IL)

(74) Представитель:

Маркин Д.Н. (RU)

(57) Раскрыт агент для редактирования ДНК, который содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты для индуцибельного обеспечения летального фенотипа у эмбрионов петушков в яйце птицы и вторую последовательность нуклеиновой кислоты для направления указанной последовательности нуклеиновой кислоты для осуществления действия указанного летального фенотипа на Z-хромосому клетки птицы. Также раскрыто применение указанного агента для редактирования ДНК.



202090585

A1

A1

202090585

ПТИЦЫ С ОТРЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ И УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение в некоторых вариантах его осуществления относится к птицам с отредактированным геномом, которые откладывают яйца, содержащие нежизнеспособные эмбрионы петушков.

Разделение по половому признаку является важным аспектом для выращивания всех видов птиц, но в особенности для выращивания бройлеров и практически всех яйцекладущих птиц и индеек. В случае бройлеров и индеек разделение по половому признаку позволяет осуществлять более подходящие уход и кормление в соответствии с потребностями обоих полов, которые несколько отличаются от унифицированного выращивания, осуществляемого на данный момент в большинстве случаев. По сути на всех коммерческих инкубаторных станциях для выращивания курочек, которые станут курами-несушками, используется разделение поголовья по половому признаку. Петушков на инкубаторной станции выбраковывают, тогда как курочек очевидно определяют для производства яиц.

В настоящее время существует три способа определения пола птицы. Пол однодневных цыплят можно определить либо путем исследования клоаки, либо по оперению. В альтернативном варианте петушков и курочек можно выращивать вместе, пока не станут очевидными вторичные половые признаки, и тогда цыплят можно разделить на основании пола. Определение пола путем исследования клоаки основано на визуальной идентификации пола на основе наличия связанных с полом анатомических структур. Определение пола по оперению основано на характеристиках оперения, которые отличаются у петушков и курочек, например, это цветовые характеристики пуха и/или и быстрая/медленная скорость роста маховых перьев. Третий способ основан на появлении естественных вторичных половых признаков, например, у самцов гребешки и борода становятся большими, чем у самок.

Определение пола однодневных цыплят путем исследования клоаки является сложным и дорогостоящим. Для идентификации пола птицы необходим высококвалифицированный персонал. Несмотря на то, что определение пола по оперению легче, его недостатком является ограничение конкретными генетическими скрещиваниями птиц. Определение пола по вторичным половым признакам является самым простым способом, но его недостаток состоит в том, что птиц обоих полов необходимо выращивать вместе в течение первых недель после вылупливания, что из-за

стоимости корма и соображений конверсии корма может быть дороже для инкубаторной станции, чем затраты на определение пола путем исследования клоаки.

Что наиболее важно, из-за повышения оптимизации производства мяса с одной стороны и производства яиц с другой стороны, петушки тех пород кур, которые оптимизированы для производства яиц, более не подходят или экономически не привлекательны для производства мяса. Таким образом, только в США и Европе ежегодно уничтожается более 500 миллионов петушков путем отравления газом, умерщвления электрическим током или измельчения. Это не только экономическая проблема, но также это все больше становится этической проблемой.

Очевидно, что в коммерческой инкубаторной отрасли существует потребность в способе, который позволял бы сортировать птиц, пока они еще находятся в яйце, и который не полагается на работу высококвалифицированных специалистов.

В Oishi et al., [Scientific Reports 6, Article number: 23980 (2016) doi:10.1038/srep23980] описан направленный мутагенез в примордиальных зародышевых клетках цыплят с применением системы CRISPR/Cas9.

В Macdonald et al., [PNAS, 2012, p. 1466-1472] описана генетическая модификация и трансмиссия зародышевой линии примордиальных зародышевых клеток с применением транспозонов piggyBac и Tol2.

В заявке США № 20060095980 описана обработка некоторого числа эндогенных примордиальных зародышевых клеток самки птицы, направленная на получение потомства, имеющего большую вероятность стать самцами по сравнению с самками.

Дополнительные работы современного уровня техники включают WO 2017094015.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложен агент для редактирования ДНК, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты для индуцибельного обеспечения летального фенотипа куриных эмбрионов мужского пола в яйце птицы и вторую последовательность нуклеиновой кислоты для направления первой последовательности нуклеиновой кислоты для осуществления действия летального фенотипа на Z-хромосому клетки птицы.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложена клеточная популяция, содержащая клетки птицы, которые содержат экзогенный полинуклеотид, который стабильно интегрирован в Z-хромосому клеток, причем экзогенный полинуклеотид предназначен для обеспечения летального

фенотипа у потомства мужского пола указанной птицы.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложена химерная птица, полученная в соответствии с описанным в данном документе способом.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложена трансгенная птица, полученная с помощью гамет химерной птицы, описанной в данном документе.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложен способ уменьшения числа петушков, вылупляемых из оплодотворенных яиц птицы, причем экзогенный полинуклеотид стабильно интегрирован в Z-хромосому птицы, экзогенный полинуклеотид предназначен для индуцибельного обеспечения летального фенотипа у потомства мужского пола указанной птицы, при этом указанный способ включает воздействие на яйца индуктора, который обеспечивает летальный фенотип, тем самым уменьшая количество петушков, вылупляемых из оплодотворенных яиц птицы.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложена химерная птица, содержащая популяцию клеток, описанную в данном документе.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложен способ получения химерной птицы, включающий введение популяции клеток, описанной в данном документе, в эмбрион птицы-реципиента в условиях, достаточных для того, чтобы по меньшей мере одна из примордиальных зародышевых клеток (ПЗК) из популяции клеток колонизировала гонаду эмбриона птицы-реципиента, с получением, таким образом, химерной птицы.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложена система редактирования ДНК, содержащая:

(i) первый агент, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты для обеспечения летального фенотипа в яйце птицы, функционально связанную с сайтом распознавания рекомбиназы, и последовательность для направления указанной первой последовательности нуклеиновой кислоты для осуществления действия указанного летального фенотипа на Z-хромосому клетки птицы; и

(ii) второй агент, содержащий вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует фермент рекомбиназы, и последовательность для направления указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты на Z-хромосому клетки

птицы.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления данного изобретения предложен способ уменьшения числа петушков, вылупляемых из оплодотворенных яиц птицы, включающий:

спаривание самки птицы с самцом птицы, при этом первый экзогенный полинуклеотид, который функционально связан с сайтом распознавания рекомбиназы, стабильно интегрирован в Z-хромосому указанного самца птицы, причем указанный экзогенный полинуклеотид предназначен для обеспечения летального фенотипа в яйце птицы, а второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий фермент рекомбиназы, стабильно интегрирован в Z-хромосому указанной самки птицы, или

указанный первый экзогенный полинуклеотид, который функционально связан с сайтом распознавания рекомбиназы, стабильно интегрирован в Z-хромосому указанной самки птицы, причем указанный экзогенный полинуклеотид предназначен для обеспечения летального фенотипа в яйце птицы, а второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий фермент рекомбиназы, стабильно интегрирован в Z-хромосому указанного самца птицы,

тем самым уменьшая число петушков, вылупляемых из оплодотворенных яиц птицы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения обеспечение осуществляется индуцибельным образом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения первая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок летальности и функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей переключатель, который регулирует экспрессию белка летальности, причем этот переключатель регулируется индуктором.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения белок летальности выбран из группы, состоящей из токсина, проапоптотического белка, антагониста BMP, ингибитора сигнального пути Wnt и антагониста FGF.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения агент для редактирования ДНК представляет собой одиночную молекулу.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержатся в неидентичных молекулах.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения первая

последовательность нуклеиновой кислоты кодирует фермент эндонуклеазы, который может осуществлять редактирование генома, и функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей переключатель, который регулирует экспрессию белка эндонуклеазы, причем этот переключатель регулируется индуктором.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит:

(i) нуклеотидную последовательность левого плеча гомологии (ЛПГ), которая по существу гомологична 5'-области, фланкирующей локус целевого гена в Z-хромосоме птицы; и

(ii) нуклеотидную последовательность правого плеча гомологии (ППГ), которая по существу гомологична 3' области, фланкирующей локус целевого гена в Z-хромосоме птицы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения индуктор выбран из группы, состоящей из температуры, ультразвука, электромагнитной энергии и химического вещества.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения переключатель содержит расщепленный фермент рекомбиназы, который объединяется с образованием активного фермента в присутствии индуктора.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения переключатель содержит индуцибельный промотор.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения фермент эндонуклеазы представляет собой фермент РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения агент для редактирования ДНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует направляющую РНК, которая нацелена на существенный ген птицы, причем нуклеотидная последовательность функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей переключатель.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения существенный ген выбран из группы, состоящей из BMPR1A, BMP2, BMP4 и FGFR1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения фермент РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазы выбран из группы, состоящей из цинк-пальцевых нуклеаз (ZFN, англ. «zinc-finger nuclease»), эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (TALEN, англ. «transcription activator-like effector nuclease»), и каспазы 9.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения агент для

редактирования ДНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует репортерный полипептид.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения индуктор представляет собой электромагнитную энергию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения электромагнитная энергия является составляющей видимого света.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения составляющая видимого света представляет собой синий свет.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки и перепела.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения клетки включают примордиальные зародышевые клетки (ПЗК).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения клетки включают гаметы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения ПЗК выбраны из группы, состоящей из ПЗК гонад, ПЗК крови и ПЗК зародышевого полулуния.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, способ дополнительно включает инкубацию химерной птицы до вылупливания после введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения способ дополнительно включает выращивание химерной птицы до половой зрелости, при этом химерная птица вырабатывает гаметы, полученные из донорских ПЗК.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения введение осуществляют путем инъекции *in ovo* (в яйцо).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения популяция клеток получена от того же вида птиц, что и птица-реципиент.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения популяция клеток получена от вида птиц, отличного от птицы-реципиента.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения популяцию клеток вводят, когда эмбрион-реципиент находится между приблизительно стадией IX в соответствии с системой стадирования Эйял-Гилади и Кохава и приблизительно стадией 30 в соответствии с системой стадирования Гамбургера и Гамильтона.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения популяцию клеток вводят, когда эмбрион-реципиент находится после стадии 14 в соответствии с системой стадирования Гамбургера и Гамильтона.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения первая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок летальности или фермент эндонуклеазы, который может осуществлять редактирование генома.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения последовательность для направления указанной первой или указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты на X-хромосому содержит:

(i) нуклеотидную последовательность левого плеча гомологии (ЛПГ), которая по существу гомологична 5'-области, фланкирующей локус целевого гена в Z-хромосоме птицы; и

(ii) нуклеотидную последовательность правого плеча гомологии (ППГ), которая по существу гомологична 3' области, фланкирующей указанный локус целевого гена в Z-хромосоме птицы.

Если не указано иное, все технические и/или научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, которые обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, можно использовать при практической реализации или тестировании вариантов осуществления изобретения, примеры способов и/или материалов описаны ниже. В случае противоречия, описание патента, включая определения, будет приоритетным. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не подразумевают обязательного ограничения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Некоторые варианты осуществления изобретения описаны в данном документе исключительно в качестве примера со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Теперь, на конкретном примере подробных графических материалов, подчеркивается, что проиллюстрированные подробности приведены в качестве примера и в целях иллюстративного обсуждения вариантов осуществления изобретения. В этом отношении описание вместе с графическими материалами проясняет для специалистов в данной области техники, как можно реализовать на практике варианты осуществления изобретения.

На графических материалах:

Фиг. 1 представляет собой рисунок, иллюстрирующий получение оптогенетической индуцибельной линии цыплят, из которой будут вылупливаться только

цыплята курочек. При скрещивании петуха дикого типа (ZZ) с генетически модифицированной курицей (ZW) все женские оплодотворенные яйца будут нести хромосомы ZW дикого типа, а Z-хромосома поступает от петуха ДТ. Все мужские оплодотворенные яйца будут нести ZZ-хромосомы, в которых Z с красной меткой получена из генома курицы. Это хромосома, подлежащая нацеливанию. При освещении оплодотворенных яиц синим светом оптогенетическая система в этой хромосоме станет активной и активирует механизм гибели, который приведет к ранней эмбриональной смертности вскоре после откладки яиц. Самки, на которых освещение синим светом не окажет воздействия, будут расти до зрелости и будут откладывать бесплодные яйца для еды.

На Фиг. 2 проиллюстрирована стратегия управления экспрессией генов с помощью освещения синим светом. Происходит создание двух слитых белков: Cry2 с N-концом Cre (Cry2-Cre-N-конец) и CIBN, слитого с C-концом Cre (CIBN-Cre-C-конец). Без освещения синим светом Cre неактивен. При освещении синим светом CRY2 и CIBN образуют гетеродимер, а две части Cre объединяются, образуя активный фермент Cre¹¹.

На Фиг. 3 проиллюстрированы плечи гомологии в хромосоме Z. Изображена геномная область ниже локуса Hint1 (зеленая стрелка). 5' и 3' плечи, ПГ-1 и ПГ-2 соответственно, изображены в красном цвете. Праймеры для амплификации плеч обозначены желтыми стрелками. Между плечами гомологии в обеих цепях ДНК присутствуют последовательности высокой уникальности, специфичные и подходящие для CRISPR-Cas9 (зеленые прямоугольники). На нижней части фигуры подробно проиллюстрирована область между двумя плечами гомологии.

Проиллюстрирована последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 1.

На Фиг. 4А–С проиллюстрированы нацеливающие векторы в соответствии с вариантами осуществления данного изобретения. Нацеливающий вектор содержит 3 основных элемента. Первый – 5' и 3' плечи гомологии (ПГ, голубой цвет) для гомологичной рекомбинации (ГР), фланкирующие всю вставленную кассету, второй – светоиндуцируемая система, в данном случае Cry2-CreN и CIBN-CreC, и третий – кассета гена летальности. (А) Структура построения одиночного нацеливающего вектора, содержащего 5' ПГ, за которым следует промотор pGK (темно-синий прямоугольник), который управляет экспрессией генов Cry2-CreN и CIBN-CreC (красные прямоугольники), которые разделены саморасщепляющимся пептидом P2A (фиолетовый прямоугольник). За этим элементом следует кассета гена летальности, которая содержит промотор pGK, за которым следуют сайты LoxP (желтый круг) СТОП (красный восьмиугольник) LoxP

(LSL), за которыми следует ген, индуцирующий летальность. За этой кассетой следует 3' ПГ (светло-синий прямоугольник). При индукции света Cry2-CreN и CIBN-CreC димеризуются с образованием активной формы Cre. Последний затем вырезает элемент LSL, что обеспечивает экспрессию индуцирующего летальность гена, которая приводит к гибели эмбрионов среди всех эмбрионов, несущих этот вектор. (В) Альтернативный подход к А, вместо использования элемента LSL, используют стратегию переворота Dio-Lox (желтые треугольники). Между сайтами Dio-Lox вносят ЗФБ (зеленый флуоресцентный белок, англ. «green fluorescent protein» или «GFP»), за которым следует сайт полиаденилирования №1 (PA1, серый прямоугольник) и ген летальности, за которым следует другой сайт полиаденилирования #2 (PA2) в обратной ориентации. В этом случае до активации светом промотор рGK управляет экспрессией ЗФБ. После активации светом кассета между сайтами Dio-Lox переворачивается, и ген летальности теперь находится в правильной ориентации для экспрессии, в то время как ЗФБ теперь находится в обратной ориентации и больше не активен. С) Альтернативный подход к А или В. После активации Cre, происходит удаление LSL и экспрессия Cas9 и онРНК. Это приводит к введению миссенс-мутации в кодирующую область существенного гена, вызывая тем самым эмбриональную летальность.

На Фиг. 5А–F: получение и изучение характеристик линии ПЗК. А, культура ПЗК; В, слева, экспрессия мРНК различных маркеров плюрипотентных и зародышевых клеток, как указано. Справа, репрезентативная характеристика половой идентификации женских ПЗК (слева, два продукта ПЦР рибосомального S18 и W-хромосомы) и мужских ПЗК (справа, только рибосомальный S18). С, окрашивание антителами ПЗК антигена SSEA1. D, трансфекция ПЗК кодирующей рCAGG-GFP плазмидой с применением реагента липофектамина 2000. Е, трансфекция ПЗК с применением электропорации кодирующей рCAGG-GFP плазмидой. F, гонада (семенник) эмбриона через 10 суток после трансплантации ЗФБ-экспрессирующими культивируемыми ПЗК.

Фиг. 6А–С. Конструирование сайтов онРНК для CRISPR-опосредованного нацеливания. Представление геномной области в Z-хромосоме для конструирования оптимальных сайтов нацеливания CRISPR. Представлены первые 12 последовательностей онРНК (направляющие №1–№12), из которых были выбраны направляющие №1 и №3, которые частично перекрываются, в противоположных ориентациях. Представлены потенциальные нецелевые последовательности направляющей №1. В приведенной ниже Таблице 1 приведены последовательности направляющих РНК, представленных на Фиг. 6В.

Таблица 1

Направляющая	SEQ ID NO:	Последовательность
1	66	GCCAAATAAGGCACGTTATC
2	67	AATGTGGAAACGGCCAAATA
3	68	ACCAGATAACGTGCCTTATT
4	69	ACATGACAGCACGATTTTGT
5	70	CTGGTATGAACCAATCAGAG
6	71	TGGTATGAACCAATCAGAGT
7	72	GACCTTGATGCAGAGAAAAC
8	73	CTCCTGTTTTCTCTGCATCA
9	74	GCAGAGAAAACAGGAGAAGA
10	75	AGAAGGATGAGAAAAGAATG
11	76	CTGTCATGTCCCACTCTGAT
12	77	ATGAGAAAAGAATGTGGAAA

10 лучших результатов поиска потенциальных нецелевых последовательностей для направляющей №1, проиллюстрированных на Фиг. 6С, из 15 последовательности которых обобщены в Таблице 2.

Таблица 2

SEQ ID NO:	Последовательность
78	CCAACAGAAGGCACGTTATCCAG
79	TCAAAATAAAGTACGTTATCTAG
80	GGCATATAAAGCACGTTATACAG
81	GCATAATAATGTACGTTATCTGG
82	ACTAAATCAGGCACGTGATCTGG
83	GCTAAATTAAGCTCGTTATCGGG
84	GTCAAATGAGGCATGTTATCAGG
85	TTCAAATAAGCCACGTTATTCAG
86	GTCAAACAAGGCATGTTATCAGG
87	CCCTAATAAAGCACGTTTTTCAGG

Фиг. 7А–С. Подтверждение активности CRISPR с помощью эндонуклеазного анализа. А. Положительный контроль эндонуклеазного анализа с применением отожденного 320 п. о. ПЦР-продукта ДТ и мутированного продукта в предсказанном сайте расщепления CRISPR1 в указанных соотношениях. В. Эндонуклеазный анализ для 12 колоний, трансфицированных плазмидой CRISPR1. С. Эндонуклеазный анализ для 12 колоний, трансфицированных плазмидой CRISPR3. Следует отметить, что расстояние

между двумя предсказанными сайтами расщепления CRISPR1 и CRISPR3 составляет 12 п. о.

Фиг. 8A–D. Подтверждение активности CRISPR с помощью секвенирования ДНК. А. Хроматограмма ДНК геномной области ДТ в предсказанном сайте расщепления CRISPR1, демонстрирующая нормальную последовательность в качестве отрицательного контроля. Б. Последовательность смеси ДТ и искусственно мутированных ПЦР-продуктов, демонстрирующая появление двойных пиков (синяя стрелка) после предсказанного сайта расщепления, в качестве положительного контроля. С. Секвенирование отрицательной колонии, демонстрирующее нормальную последовательность. D. Последовательность положительной колонии, демонстрирующая появление двойных пиков после сайта расщепления CRISPR1 (синяя стрелка). Изображена последовательность AGATAACGT (SEQ ID NO: 65).

Фиг. 9A–F. Конструирование нацеливающего вектора для геномной интеграции в Z-хромосому. А – Геномную ДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР с праймерами P1 и P2. Эта область содержит 5' ПГ и 3' ПГ, фланкирующие область, содержащую сайт CRISPR. В – Продукт размером ~ 3 т. п. о., расположенный ниже локуса HINTZ, лигировали в челночный вектор pJet1.2. Эту плазмиду использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами P3 и P4. Эти праймеры имеют последовательности удлинения (обозначена цветными фигурными скобками), которые соответствуют эквивалентным областям в фрагменте pCAGG-Neo-IRES-GFP (D). С – Линеаризованный продукт, вектор, содержащий два плеча гомологии, за исключением области, содержащей сайт CRISPR, фланкируемый последовательностями, которые связывают концы кассеты pCAGG-Neo-IRES-GFP во время реакции Гибсона. D – Плазмиду pCAGG-Neo-IRES-GFP использовали в качестве матрицы для ПЦР-реакции с праймерами P5 и P6. Эти праймеры содержат последовательности удлинения (обозначенные цветными фигурными скобками), которые соответствуют эквивалентным областям по краям плеч гомологии. Е – Линеаризованная вставочная кассета, фланкируемая последовательностями, которые связывают концы плеч гомологии. Вектор и вставку стыковали вместе для создания конечной плазмиды нацеливающего вектора, используя реакцию сборки Гибсона¹⁰. F – Нацеливающий вектор.

Фиг. 10A–D. Котранфекция нацеливающего вектора и плазмид CRISPR в ПЗК. А. Опосредованная липофекцией котранфекция CRISPR1 в ПЗК и ГР нацеливающих векторных плазмид. В. Через две недели после отбора с помощью G-418 > 99% резистентных ПЗК были положительными по ЗФБ. С. Через десять суток после инъекции

целевых ПЗК в эмбрион-хозяин было обнаружено, что многочисленные клетки локализуются в гонадах (семенниках). D. Гонады вырезали и проводили и иммуноокрашивание антителом против ЗФБ и сканирование с помощью конфокального микроскопа (окрашивание антител к ЗФБ зеленым и контрокрашивание ядер 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАФИ) синим).

Фиг. 11A–D. ПЦР-верификация ГР-интеграции в ПЗК, отсортированных методом FACS. A. FACS-сортировка ПЗК, устойчивых к G-418. Гейтинг FACS был разработан для сортировки одиночных (од.) ЗФБ-положительных клеток, которые были отсортированы в виде пула или отдельных клеток в 96-луночной планшете. B. Для ПЦР-анализа сконструировали два набора праймеров для 5' сайта интеграции (P7 и P8) и 3' сайта интеграции (P9 и P10). C. Геномную ДНК, выделенную из объединенных клеток, использовали в качестве матрицы для ПЦР, а ДНК ДТ служила в качестве отрицательного контроля. Предсказанные полосы на 1,6 и 1,8 т. п. о. были видны для правильной ГР-интеграции в 5' и 3' области, соответственно. D. Геномную ДНК, выделенную из колоний мужских и женских клеток, полученных из ПЗК, отсортированных методом сортировки одиночных клеток FACS, использовали в качестве матрицы для ПЦР, а ДНК ДТ служила в качестве отрицательного контроля. Предсказанные полосы на 1,6 и 1,8 т. п. о. были видны для правильной ГР-интеграции в 5' и 3' области, соответственно.

Фиг. 12A–D. Саузерн-блот анализ ГР-интеграции. A – схематическое представление ожидаемых продуктов расщепления BglII в Саузерн-блот анализе для аллели ДТ и аллели, которая подверглась ГР-интеграции. Зонды, используемые для 5', 3' сайтов интеграции и для нео, обозначены желтыми квадратами. Описан ожидаемый размер продукта после расщепления BglII для каждого ДНК-зонда. B – Получение dig-меченных зондов методом ПЦР. dig-меченные зонды (+) или немеченные зонды (-) анализировали на агарозном геле. Следует отметить, что dig-меченные продукты смещены выше, чем их фактический размер, что подтверждает интеграцию dig-меченных нуклеотидов. Указаны наборы праймеров, используемых для амплификации зондов. C – Саузерн-блот анализ с 5' и 3' зондами для ДНК, экстрагированной из объединенных и очищенных колоний, полученных из мужских ПЗК. ДНК ДТ, экстрагированная из исходной линии до ГР, служила в качестве отрицательного контроля. D – Саузерн-блот анализ с 5' и Neo-зондами для женских ПЗК. В обоих случаях видна одна полоса на 7,5 т. п. о., что указывает на то, что произошла правильная ГР и была интегрирована только одна копия нацеливающего вектора.

Фиг. 13. Подтверждение оптогенетической системы в клетках HEK293 *in vitro*.

Тройная трансфекция плазмидами pmCherry-Cry2-CreN, pmCherry-CIBN-CreC и pB-RAGE-GFP. Через двадцать четыре часа после трансфекции клетки экспериментальной группы в течение 15 секунд освещали синим светом, в то время как контрольные клетки держали в темноте (верхний ряд). После освещения (нижний ряд) клетки дополнительно инкубировали в течение 24 часов. В этих клетках экспрессия ЗФБ была очевидной, подтверждая активацию фермента Cre после освещения синим светом.

Фиг. 14. Подтверждение оптогенетической системы *in ovo* в куриных эмбрионах, которые инкубировали в течение 5460 часов перед электропорацией. Тройная электропорацию в куриные эмбрионы плазмид pmCherry-Cry2-CreN, pmCherry-CIBN-CreC и pB-RAGE-GFP. Через двенадцать часов после электропорации эмбрионы экспериментальной группы в течение 15 секунд освещали синим светом *in ovo*, тогда как контрольные эмбрионы держали в темноте (верхний ряд). После освещения (нижний ряд) эмбрионы из обеих групп инкубировали в течение дополнительных 12 часов. После инкубации клетки, экспрессирующие ЗФБ, были отчетливо видны в освещенной группе, что подтверждает активацию оптогенетической системы и фермента Cre после освещения синим светом в куриных эмбрионах *in ovo*.

Фиг. 15A–F. Конструирование одиночного экспрессионного вектора оптогена под управлением промотора CAGG. В качестве матрицы использовали плазмиды оптогенов pmCherry-CIBN-CreC и pmCherry-Cry2-CreN для амплификации слитых белков оптогенов, используя праймеры P40–P41 и P42–P43 соответственно (15A). Два продукта имеют перекрывающиеся последовательности в сайте P2A, который был внесен в праймеры P41 и P42. Это позволило провести один цикл ПЦР с удлинением выступа, чтобы объединить два фрагмента (15B) и один, который был лигирован в челночный вектор pJet1.2 (15C). Используя праймеры P44 и P45, которые содержат хвосты с сайтами рестрикции SmaI и NheI соответственно, получали продукт, проиллюстрированный на 15D. Этот продукт расщепляли, используя соответствующие рестрикционные ферменты и лигировали в pCAGG-IRES-GFP (15E), который расщепляли теми же ферментами (15F).

Фиг. 16. Подтверждение активности плазмиды pCAGG-Optogene в клетках HEK293. Котрансфекция плазмидами pCAGG-Optogene и pB-RAGE-mCherry. Через двадцать четыре часа после трансфекции, в то время как отрицательную контрольную группу держали в темноте (верхний ряд), клетки экспериментальной группы в течение 15 секунд освещали синим светом (нижний ряд). После освещения (нижний ряд) клетки дополнительно инкубировали в течение 24 часов. В этих клетках наблюдалась экспрессия mCherry (белые стрелки), подтверждающая активацию фермента Cre плазмидой pCAGG-

Optogene после освещения синим светом.

Фиг. 17. Подтверждение одновекторной стратегии с применением плазмиды pCAGG-Optogenes *in ovo*. Куриные эмбрионы на стадии 14-16 H&H совместно электропорировали плазмидами pCAGG-Optogenes и pB-RAGE-mCherry. Последняя плазида служит репортерным геном в отношении активности оптогенной системы. Через двенадцать часов после электропорации эмбрионы экспериментальной группы (нижний ряд) в течение 15 секунд освещали синим светом *in ovo*, тогда как контрольные зародыши держали в темноте (верхний ряд). Эмбрионы дополнительно инкубировали в течение 12 часов. После инкубации ЗФБ-экспрессирующие клетки были отчетливо видны в обеих группах, что указывает на успешную электропорацию, однако только в освещенной группе были видны mCherry-экспрессирующие клетки, что подтверждает активацию оптогенетической системы и фермента Cre после освещения синим светом в куриных эмбрионах *in ovo*.

Фиг. 18. Экспрессия DTA под управлением промотора pGK ингибирует синтез белка *in ovo*. Эмбрионы на стадии 14-16 H&H электропорировали экспрессионным вектором pGK-IRES-GFP (верхний ряд) или pGK-DTA-IRES-GFP (нижний ряд). Эмбрионы отрицательного контроля широко экспрессируют ЗФБ (верхний ряд, стрелка), что указывает на нормальный синтез белка. DTA-экспрессирующие клетки не демонстрируют экспрессию ЗФБ (нижний ряд), что указывает на то, что синтез белка в этих эмбрионах ингибируется. Представлены изображения только ЗФБ, только светлого поля и наложения ЗФБ на светлое поле.

Фиг. 19А–В иллюстрируют нацеливающие векторы в соответствии с дополнительными вариантами осуществления данного изобретения. В этих векторах активирующий фермент (например, Cre) отделен от кассеты гена летальности. На Фиг. 19А активирующий фермент вставлен в геном материнской курицы, а неактивная кассета летальности вставлена в Z-хромосому петуха, который является гомозиготным по этой аллели. В этом случае активация летальности в мужских эмбрионах осуществляется путем скрещивания двух трансгенных родителей без необходимости в индукции светом. Cre у всех самцов удаляет LSL в материнской Z-хромосоме, обеспечивая, таким образом, возможность экспрессии гена летальности, тогда как женский эмбрион содержит неактивную кассету летальности, таким образом, он остается незатронутым. В альтернативном варианте проводят нацеливание на Z-хромосому материнской курицы переворачивающейся кассеты Dio-Lox, содержащей рекомбиназу FLP в правом направлении, за которой следует ген летальности в обратной ориентации, управляемый

промотором CAGG (Фиг. 19B). Петух снова является гомозиготным по Z-хромосоме, на которую нацелена кассета CAGG-Cre, фланкируемая сайтами FRT. После скрещивания этих двух птиц мужские эмбрионы будут экспрессировать Cre, расположенный в отцовской Z-хромосоме, кассета Dio-Lox перевернется, а и ген летальности станет активным, что приведет к эмбриональной летальности мужского эмбриона. Зигота женского эмбриона от этого скрещивания содержит материнский фермент рекомбиназы FLP, который вырабатывался во время оогенеза. Этот материнский белок удаляет кассету CAGG-Cre из Z-хромосомы, оставляя женский эмбрион живым только со «шрамом» FRT в Z-хромосоме.

ОПИСАНИЕ КОНКРЕТНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение в некоторых вариантах его осуществления относится к птицам с отредактированным геномом, которые откладывают яйца, содержащие нежизнеспособные эмбрионы петушков.

Прежде чем подробно объяснить по меньшей мере один вариант осуществления изобретения, следует понять, что изобретение не обязательно ограничено в своем применении подробностями, изложенными в нижеследующем описании или проиллюстрированными в примерах. Изобретение допускает другие варианты осуществления его практической реализации или проведения различными способами.

Разделение по половому признаку является важным аспектом для выращивания всех видов птиц, но в особенности для выращивания бройлеров и практически всех яйцекладущих птиц и индеек. В случае бройлеров и индеек разделение по половому признаку позволяет осуществлять более подходящие уход и кормление в соответствии с потребностями обоих полов, которые несколько отличаются от унифицированного выращивания, осуществляемого на данный момент в большинстве случаев. Практически на всех коммерческих инкубаторных станциях для выращивания курочек, которые станут курами-несушками, используется разделение поголовья по половому признаку. Петушков на инкубаторной станции выбраковывают, тогда как курочек очевидно определяют для производства яиц.

Авторы данного изобретения придумали способ, как избавиться от необходимости массового убоя миллиардов петушков во всем мире. В частности, авторы изобретения разработали способ создания породы кур, в которой «матери» из племенной стаи будут откладывать оплодотворенные яйца, из которых будут вылупливаться только несушки,

тогда как мужские эмбрионы прекратят развиваться вскоре после оплодотворения. Таким образом, будет устранена необходимость убивать петушков, а также будет обеспечена экономия 50% ценного инкубационного пространства. Важно отметить, что как несушки, так и бесплодные яйца, являющиеся конечным продуктом для потребителя, будут во всех аспектах идентичны несушкам и пищевым яйцам, которые в настоящее время производятся в этой индустрии (т. е. генетически не модифицированными).

Хотя данное изобретение сводится к практической реализации, авторы данного изобретения разработали нацеливающий вектор, содержащий ПГ, фланкирующие гены Neo и ЗФБ под управлением промотора CAGG, и показали, что он подвергается правильной ГР в Z-хромосому, что было подтверждено с помощью ПЦР (Фиг. 11A–D) и Саузерн-блот анализа (Фиг. 12A–D). Кроме того, было обнаружено, что одновекторная стратегия оптогенной системы, которая была сконструирована в векторе pCAGG-Optogene, была активной как *in vitro*, так и *in ovo* в живых куриных эмбрионах (Фиг. 14). Наконец, экспрессия ДТА в куриных эмбрионах приводила к ингибированию синтеза белка (Фиг. 18).

Таким образом, в соответствии с первым аспектом данного изобретения предложен агент для редактирования ДНК, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты для индуцибельного обеспечения летального фенотипа у эмбрионов петушков в яйце птицы и вторую последовательность нуклеиновой кислоты для направления первой последовательности нуклеиновой кислоты для осуществления действия летального фенотипа на Z-хромосому клетки птицы.

В контексте данного документа термины «птица» и «виды птиц» относятся к любым видам птиц, включая, но не ограничиваясь этим, кур, индеек, уток, гусей, перепелов, фазанов и страусов.

В контексте данного документа термин «яйцо» относится к птичьему яйцу, которое содержит живой птичий эмбрион. Таким образом, термин «яйцо» предназначен для обозначения оплодотворенного птичьего яйца, а в одном варианте осуществления яйцо, содержащее птичий эмбрион, способно к нормальному эмбриогенезу.

Агент для редактирования ДНК (содержащийся в одиночной конструкции нуклеиновой кислоты или комбинации из конструкций нуклеиновых кислот) содержит нацеливающие последовательности, которые обеспечивают стабильную интеграцию первой последовательности нуклеиновой кислоты в Z-хромосому клетки птицы. Агент для редактирования ДНК может быть сконструирован с помощью технологии рекомбинантных ДНК, хорошо известной специалистам в данной области техники.

Нацеливающие последовательности выбраны так, чтобы первая последовательность нуклеиновой кислоты специфически интегрировалась в Z-хромосому, но не в любую другую хромосому клетки. Кроме того, нацеливающая последовательность выбрана в зависимости от того, какой способ используется для интеграции первой последовательности нуклеиновой кислоты в хромосому. Способы интеграции последовательностей нуклеиновых кислот в хромосомы хорошо известны в данной области техники [смотрите, например, Menke D. *Genesis* (2013) 51: - 618; Capecchi, *Science* (1989) 244:1288-1292; Santiago et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:5809-5814; заявки на международные патенты №№ WO 2014085593, WO 2009071334 и WO 2011146121; патенты США №№ 8771945, 8586526, 6774279 и публикации заявок на патенты UP №№ 20030232410, 20050026157, US20060014264; содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки] и включают направленную гомологичную рекомбинацию, применение сайт-специфических рекомбиназ и редактирование генома с помощью сконструированных нуклеаз. Также предусмотрено применение РВ-транспозаз. Агенты для введения нуклеотидных изменений в представляющий интерес ген могут быть разработаны с помощью общедоступных источников или получены на коммерческой основе от Transposagen, Addgene и Sangamo Biosciences.

В одном варианте осуществления в основе получения агента для редактирования ДНК лежит спонтанная гомологичная рекомбинация для вставки первой последовательности нуклеиновой кислоты в Z-хромосому клетки. В этом варианте осуществления агент для редактирования ДНК содержит плечи гомологии, которые служат в качестве нацеливающих последовательностей.

Агент для редактирования ДНК может фланкироваться двумя плечами, которые являются гомологичными или имеют гомологию или идентичность около 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по меньшей мере с одной последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащейся в целевых локусах в Z-хромосоме, которая служит сайтом интеграции для облегчения специфической интеграции посредством НГР.

Плечи гомологии соответствуют геномной последовательности, которая присутствует в Z-хромосоме. Предпочтительно, геномная последовательность находится ниже гена, который является транскрипционно активным (например, ниже гена *Hint1*). Плечи гомологии, как правило, имеют длину по меньшей мере 500 нуклеотидов,

например, 500–3000 нуклеотидов. Как правило, необходимый размер плеч гомологии зависит от длины кассет, которые фланкируются этими плечами. Для меньших кассет нужны более короткие плечи и наоборот. Гомологичная рекомбинация может происходить спонтанно. Другой предусмотренной мишенью является Isl1 (генный ID 369383), также в Z-хромосоме, который экспрессируется, начиная с ранних стадий эмбриогенеза.

Ниже приведено описание различных дополнительных типовых способов, которые могут использоваться агентом для редактирования ДНК для интеграции первой последовательности нуклеиновой кислоты в Z-хромосому в соответствии с конкретными вариантами осуществления данного изобретения, и описание нацеливающих последовательностей, которые необходимы для осуществления этой цели.

Редактирование генома с помощью сконструированных эндонуклеаз – этот подход относится к способу обратной генетики, в котором используются искусственно сконструированные нуклеазы, чтобы разрезать и создавать специфические двухцепочечные разрывы в необходимой(ых) локация(ях) в геноме (т. е. в Z-хромосоме), которые затем восстанавливаются с помощью таких клеточных эндогенных процессов, как направляемая гомологией репарация (НГР) и нехомологичное соединение концов (НГСК). НГСК непосредственно соединяет концы ДНК в двухцепочечном разрыве, тогда как в НГР используется гомологичная последовательность в качестве матрицы для регенерации недостающей последовательности ДНК в точке разрыва. Чтобы внести конкретные нуклеотидные модификации в геномную ДНК, во время НГР должна присутствовать матрица репарации ДНК, содержащая необходимую последовательность. Редактирование генома нельзя проводить, используя традиционные рестрикционные эндонуклеазы, поскольку большинство рестрикционных ферментов распознают несколько пар оснований в ДНК в качестве своей мишени, и существует очень высокая вероятность того, что распознанная комбинация пар оснований будет обнаружена во многих локациях по всему геному, что приведет к множественным разрезам, не ограниченным необходимой локацией. На сегодняшний день с тем, чтобы преодолеть эту проблему и создать сайт-специфические одно- или двухцепочечные разрывы было обнаружено и разработано несколько отличных классов нуклеаз. К ним относятся мегануклеазы, цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и система CRISPR/Cas.

Мегануклеазы – Мегануклеазы обычно разделяют на четыре семейства: семейство LAGLIDADG, семейство GIY-YIG, семейство His-Cys box и семейство HNH. Эти

семейства характеризуются структурными мотивами, которые влияют на каталитическую активность и последовательность распознавания. Например, члены семейства LAGLIDADG характеризуются наличием одной или двух копий консервативного мотива LAGLIDADG. Четыре семейства мегануклеаз существенно отличаются друг от друга в отношении консервативных структурных элементов и, следовательно, специфичности последовательности распознавания ДНК и каталитической активности. Мегануклеазы обычно встречаются у видов микроорганизмов и обладают уникальным свойством иметь очень длинные последовательности распознавания (> 14 п. о.), что делает их от природы очень специфическими для разрезания в необходимой локации. Это можно использовать для создания сайт-специфических двухцепочечных разрывов при редактировании генома. Специалист в данной области техники может использовать эти встречающиеся в природе мегануклеазы, однако количество таких встречающихся в природе мегануклеаз ограничено. Чтобы преодолеть эту проблему, использовали мутагенез и высокопроизводительные способы скрининга для создания вариантов мегануклеаз, которые распознают уникальные последовательности. Например, сливали различные мегануклеазы для создания гибридных ферментов, которые распознают новую последовательность. В альтернативном варианте можно изменять взаимодействующие с ДНК аминокислоты мегануклеазы, чтобы сконструировать специфические в отношении последовательности мегануклеазы (смотрите, например, патент США 8021867). Мегануклеазы можно конструировать, используя способы, описанные, например, в Certo, MT et al. *Nature Methods* (2012) 9:073-975; патентах США №№ 8304222; 8021867; 8119381; 8124369; 8129134; 8133697; 8143015; 8143016; 8148098; или 8163514, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В альтернативном варианте мегануклеазы с сайт-специфическими характеристиками разрезания можно получать, используя коммерчески доступные технологии, например, технологию редактирования генома Precision Biosciences Directed Nuclease Editor™.

ZFN и TALEN – Два различных класса сконструированных нуклеаз, цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) и эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), оба оказались эффективными при создании целевых двухцепочечных разрывов (Christian *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010).

По сути, в технологии рестрикционных эндонуклеаз ZFN и TALEN используется неспецифический фермент для разрезания ДНК, который связан со специфическим ДНК-связывающим доменом (или рядом цинк-пальцевых доменов или повторов TALE

соответственно). Как правило, выбирают рестрикционный фермент, чей сайт распознавания ДНК и сайт расщепления отделены друг от друга. Расщепляющую часть отделяют и затем связывают с ДНК-связывающим доменом, в результате чего получают эндонуклеазу с очень высокой специфичностью в отношении необходимой последовательности. Примером рестрикционного фермента с такими свойствами является FokI. Кроме того, преимуществом FokI является то, что для наличия нуклеазной активности требуется димеризация, и это означает, что специфичность резко возрастает, поскольку каждый нуклеазный партнер распознает уникальную последовательность ДНК. Для усиления этого эффекта были сконструированы нуклеазы FokI, которые могут функционировать только в виде гетеродимеров и обладают повышенной каталитической активностью. Функциональные гетеродимерные нуклеазы исключают возможность нежелательной гомодимерной активности и, таким образом, увеличивают специфичность двухцепочечного разрыва.

Таким образом, например, для нацеливания на конкретный сайт, ZFN и TALEN конструируют в виде пар нуклеаз, причем каждый член пары предназначен для связывания смежных последовательностей в целевом сайте. После временной экспрессии в клетках нуклеазы связываются со своими целевыми сайтами, а домены FokI гетеродимеризуются, создавая двухцепочечный разрыв. Восстановление этих двухцепочечных разрывов посредством пути нехомологичного соединения концов (НГСК) чаще всего приводит к появлению инделов, которые представляют собой небольшие делеции или небольшие вставки последовательности. Поскольку каждое восстановление, выполненное посредством НГСК, является уникальным, использование одной пары нуклеаз может привести к получению аллельного ряда с некоторым диапазоном разных делеций в целевом сайте. Как правило, делеции варьируются в диапазоне от нескольких пар оснований до нескольких сотен пар оснований в длину, но в клеточной культуре успешно создавали более крупные делеции, используя две пары нуклеаз одновременно (Carlson *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). Кроме того, когда фрагмент ДНК с гомологией к целевой области вносят в сочетании с парой нуклеаз, двухцепочечный разрыв может быть восстановлен путем направляемой гомологией репарации с созданием специфических модификаций (Li *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Urnov *et al.*, 2005).

Хотя нуклеазные части как ZFN, так и TALEN имеют сходные свойства, разница между этими сконструированными нуклеазами заключается в их пептиде распознавания ДНК. В основе ZFN лежат цинковые пальцы Cys2-His2, а в основе TALEN – TALE. Оба

этих ДНК-распознающих пептидных домена характеризуются тем, что они встречаются в природе в комбинациях в своих белках. Цинковые пальцы Cys2-His2, как правило, встречаются в повторах, которые находятся на расстоянии 3 п. о. и встречаются в различных комбинациях в ряде белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами. С другой стороны, TALE встречаются в повторах с соотношением распознавания один к одному между аминокислотами и распознаваемыми парами нуклеотидов. Поскольку как цинковые пальцы, так и TALE встречаются в повторяемых паттернах, можно пробовать разные комбинации, чтобы создать широкий ряд специфичностей последовательностей. Подходы для создания сайт-специфических цинк-пальцевых эндонуклеаз включают, помимо прочего, например, модульную сборку (где цинковые пальцы, коррелирующие с триплетной последовательностью, соединены в ряд, чтобы покрыть необходимую последовательность), OPEN (отбор в условиях низкой жесткости пептидных доменов против триплетных нуклеотидов с последующим отбором в условиях высокой жесткости комбинации пептидов против конечной мишени в бактериальных системах) и бактериальный однокрибридный скрининг библиотек цинковых пальцев. ZFN также можно конструировать и получать на коммерческой основе, например, от Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

Способ конструирования и получения TALEN описан, например, в Reyon et al. Nature Biotechnology 2012 May;30(5):460-5; Miller et al. Nat Biotechnol. (2011) 29: 143-148; Cermak et al. Nucleic Acids Research (2011) 39 (12): e82 и Zhang et al. Nature Biotechnology (2011) 29 (2): 149-53. Недавно разработанная веб-программа под названием Mojo Hand была представлена Клиникой Майо для разработки конструкций TAL и TALEN для применений, связанных с редактированием генома (доступ можно получить на [www\(точка\)talendesign\(точка\)org](http://www.точкаtalendesign.точкаorg)). TALEN также можно конструировать и получать на коммерческой основе, например, от Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

Система CRISPR-Cas – Многие бактерии и археи имеют эндогенные адаптивные иммунные системы на основе РНК, которые могут разрушать нуклеиновые кислоты проникающих фагов и плазмид. Эти системы состоят из генов коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), которые вырабатывают компоненты РНК, и связанных с CRISPR (Cas) генов, которые кодируют белковые компоненты. РНК CRISPR (crРНК) содержат короткие участки гомологии с конкретными вирусами и плазмидами и действуют в качестве направляющих, направляя нуклеазы Cas для деградации комплементарных нуклеиновых кислот соответствующего патогена. Исследования системы CRISPR/Cas типа II из *Streptococcus pyogenes* показали, что три

компонента образуют комплекс РНК/белок и вместе являются достаточными для специфической в отношении последовательности нуклеазной активности: нуклеаза Cas9, crРНК, содержащая 20 пар оснований гомологии с целевой последовательностью, и транс-активирующая crРНК (tracrРНК) (Jinek et al. *Science* (2012) 337: 816-821.). Дополнительно было продемонстрировано, что синтетическая химерная направляющая РНК (нРНК), состоящая из слияния между crРНК и tracrРНК, может направлять Cas9 для расщепления целевых ДНК, которые являются комплементарными к crРНК *in vitro*. Также было продемонстрировано, что временную экспрессию Cas9 в сочетании с синтетическими нРНК можно использовать для получения целевых двухцепочечных разрывов в ряде различных видов (Cho *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; DiCarlo *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2013a,b; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013).

Система CRISPR/Cas для редактирования генома содержит два отличных компонента: нРНК и эндонуклеазу, например, Cas9. нРНК, как правило, представляет собой последовательность из 20 нуклеотидов, кодирующую комбинацию целевой гомологичной последовательности (crРНК) и эндогенной бактериальной РНК, которая связывает crРНК с нуклеазой Cas9 (tracrРНК) в одном химерном транскрипте. Комплекс нРНК/Cas9 взаимодействует с целевой последовательностью путем спаривания оснований между последовательностью нРНК и комплементарной геномной ДНК. Для успешного связывания Cas9 геномная целевая последовательность должна также содержать правильную последовательность мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM, англ. «Protospacer Adjacent Motif»), следующую непосредственно за целевой последовательностью. Связывание комплекса нРНК/Cas9 локализует Cas9 в геномной целевой последовательности так, что Cas9 может разрезать обе цепи ДНК, приводя к двухцепочечному разрыву. Как и в случае ZFN и TALEN, двухцепочечные разрывы, созданные CRISPR/Cas, могут подвергаться гомологичной рекомбинации или НГСК.

Нуклеаза Cas9 имеет два функциональных домена: RuvC и HNH, каждый из которых разрезает отличную цепь ДНК. Когда оба этих домена активны, Cas9 создает двухцепочечные разрывы в геномной ДНК.

Существенным преимуществом CRISPR/Cas является то, что высокая эффективность этой системы в сочетании с возможностью легко создавать синтетические нРНК обеспечивают возможность одновременного нацеливания на некоторое количество генов. Кроме того, в большинстве клеток, несущих мутацию, присутствуют двухаллельные мутации в целевых генах.

При этом очевидная гибкость во взаимодействиях спаривания оснований между

последовательностью нРНК и целевой последовательностью геномной ДНК позволяет вырезать неточные совпадения с целевой последовательностью посредством Cas9.

Модифицированные версии фермента Cas9, содержащие один неактивный каталитический домен, RuvC- или HNH-, называются «никазами». Имея только один активный нуклеазный домен, никаза Cas9 разрезает только одну цепь целевой ДНК, создавая одноцепочечный разрыв или «ник». Одноцепочечный разрыв или ник обычно быстро восстанавливается посредством пути НГР с применением интактной комплементарной цепи ДНК в качестве матрицы. При этом два проксимальных расположенных на противоположных цепях ника, внесенных никазой Cas9, рассматриваются как двухцепочечный разрыв, что часто называют системой CRISPR с «двойным ником». Двойной ник может восстанавливаться с помощью НГСК или НГР в зависимости от необходимого эффекта на генную мишень. Таким образом, если решающее значение имеют специфичность и снижение нецелевых эффектов, использование никазы Cas9 для создания двойного ника путем конструирования двух нРНК с целевыми последовательностями в непосредственной близости и на противоположных цепях геномной ДНК уменьшит нецелевой эффект, так как любая нРНК сама по себе приведет к появлению ников, которые не изменят геномную ДНК.

Модифицированные версии фермента Cas9, содержащие два неактивных каталитических домена (мертвый (англ. «dead») Cas9 или dCas9), не обладают нуклеазной активностью, но все же способны связываться с ДНК на основе специфичности нРНК. dCas9 можно использовать в качестве платформы для регуляторов транскрипции ДНК для активации или подавления экспрессии генов путем слияния неактивного фермента с известными регуляторными доменами. Например, связывание одного dCas9 с целевой последовательностью в геномной ДНК может влиять на транскрипцию гена.

Существует ряд общедоступных инструментов, которые помогают выбрать и/или сконструировать целевые последовательности, а также списки биоинформационно определенных уникальных нРНК для разных генов разных видов, такие как инструмент конструирования CRISPR от Feng Zhang lab's, Target Finder (E-CRISP) от Michael Boutros lab's, инструменты RGEN: Cas-OFFinder, CasFinder: гибкий алгоритм для идентификации специфических мишеней Cas9 в геномах и CRISPR Optimal Target Finder.

Чтобы использовать систему CRISPR, как нРНК, так и Cas9 должны экспрессироваться в целевой клетке. Вставочный вектор может содержать обе кассеты в одной плазмиде, или же кассеты экспрессируются из двух отдельных плазмид. Плазмиды CRISPR общедоступны, например, как плазида px330 от Addgene. Кроме того, мРНК,

кодирующую Cas9 и нРНК, можно вносить в целевые клетки, а также рекомбинантный белок Cas9 в комплексе с нРНК (т. е. вносить в клетку комплекс РНП).

Редактирование генома с помощью платформы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рААВ) – эта платформа для редактирования генома основана на рААВ-векторах, которые позволяют вставлять, удалять или заменять последовательности ДНК в геномах живых клеток млекопитающих. Геном рААВ представляет собой одноцепочечную молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты (оцДНК), смысловую или антисмысловую, длина которой составляет около 4,7 т. п. о. Эти одноцепочечные вирусные ДНК-векторы имеют высокую скорость трансдукции и обладают уникальным свойством стимулировать эндогенную гомологичную рекомбинацию в отсутствие двухцепочечных разрывов ДНК в геноме. Специалист в данной области техники может сконструировать рААВ вектор для нацеливания на необходимый геномный локус и проводить грубые и/или точные изменения в эндогенных генах в клетке. Преимущество редактирования генома с помощью рААВ состоит в том, что он нацелен на одну аллель и не приводит к каким-либо нецелевым изменениям генома. Технология редактирования генома на основе рААВ коммерчески доступна, например, это система на основе рААВ GENESIS™ от Horizon™ (Cambridge, UK).

Способы определения эффективности и обнаружения изменений последовательности хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, секвенирование ДНК, электрофорез, ферментный анализ обнаружения несоответствий и анализ гибридизации, такой как ПЦР, ОТ-ПЦР, защита от РНКазы, гибридизация in situ, удлинение праймера, Саузерн-блот, Нозерн-блот и дот-блот анализ.

Изменения последовательности в конкретном гене также можно определять на уровне белка, используя, например, хроматографию, электрофоретические способы, анализ иммунообнаружения, такой как ИФА, и Вестерн-блот анализ и иммуногистохимию.

Агент для редактирования ДНК может кодировать репортерный белок, который можно легко обнаружить по его присутствию или активности, включая, но не ограничиваясь этим, люциферазу, флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, бета-галактозидазу, секретируемую плацентарную щелочную фосфатазу, бета-лактамазу, человеческий гормон роста и другие секретируемые ферментные репортеры. В общем случае репортерный ген кодирует полипептид, который в ином случае не вырабатывается

клеткой-хозяином, и который можно обнаружить с помощью анализа клетки(ок), например, прямого флуорометрического, радиоизотопного или спектрофотометрического анализа клетки(ок), и, как правило, без необходимости убивать клетки для анализа сигнала. В некоторых случаях репортерный ген кодирует фермент, который вызывает изменение флуорометрических свойств клетки-хозяина, которое можно обнаружить по качественной, количественной или полуколичественной функции или активации транскрипции. Типовые ферменты включают эстеразы, β -лактамазу, фосфатазы, пероксидазы, протеазы (тканевый активатор плазминогена или урокиназу) и другие ферменты, функции которых можно обнаружить с помощью соответствующих хромогенных или флуорогенных субстратов, которые известны специалистам в данной области техники или будут разработаны в будущем.

Кроме того, специалист в данной области техники может легко сконструировать агент для редактирования ДНК, который содержит маркеры положительного и/или отрицательного отбора для эффективного отбора трансформированных клеток, в которых произошло событие гомологичной рекомбинации с конструкцией. Положительный отбор предоставляет средства для обогащения популяции клонов, которые поглотили чужеродную ДНК. Неограничивающие примеры таких положительных маркеров включают глутаминсинтетазу, дигидрофолатредуктазу (DHFR), маркеры, которые придают устойчивость к антибиотикам, такие как кассеты устойчивости к неомицину, гигромицину, пурамицину и бластицидину-S. Маркеры отрицательного отбора необходимы для отбора против случайных интеграций и/или исключения маркерной последовательности (например, положительного маркера). Неограничивающие примеры таких отрицательных маркеров включают тимидинкиназу вируса простого герпеса (TK-VПГ), которая превращает ганцикловир (ГЦВ) в цитотоксический нуклеозидный аналог гипоксантин-фосфорибозилтрансферазу (HPRT), дифтерийный токсин (ДТ) и аденинфосфорибозилтрансферазу (ARPT).

Для облегчения гомологичной рекомбинации можно использовать химический ингибитор НГСК, такой как пиразин SCR7, для повышения эффективности ГР, опосредованной редактированием генома CRISPR. Как указано выше, агент для редактирования ДНК по этому аспекту данного изобретения содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты для индуцибельного обеспечения летального фенотипа петушков, вылупляющихся из яйца птицы.

Предпочтительно, мужские эмбрионы не выживают в яйце после ранних стадий бластуляции, известных как стадии X-XIII EG&K (Eyal-Giladi and Kochav, 1976). В одном

варианте осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать белок летальности, который функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей переключатель, который регулирует экспрессию белка летальности, причем этот переключатель регулируется индуктором.

В контексте данного документа термин «белок летальности» относится к белку, который является летальным для эмбриона птицы (например, мужского эмбриона), предотвращая, таким образом, вылупливание живого петушка из яйца. Примеры белков летальности включают, но не ограничиваются этим, токсин, цитотоксический белок, проапоптотический белок, антагонист BMP, ингибитор передачи сигналов Wnt и антагонист FGF.

Типовые токсины, предусмотренные в данном изобретении, включают, но не ограничиваются этим, экзотоксин *Pseudomonas* (доступ в GenBank № GenBank ABU63124), дифтерийный токсин (доступ в GenBank № AAV70486) и токсин рицина (доступ в GenBank № EEF27734).

Типовые цитотоксические белки включают, но не ограничиваются этим, интерлейкин-2 (доступ в GenBank № CAA00227), CD3 (доступ в GenBank № P07766), CD16 (доступ в GenBank № NP_000560.5), интерлейкин-4 (доступ в GenBank № NP_000580.1) и интерлейкин-10 (доступ в GenBank № P22301).

Типовые проапоптотические белки, предусмотренные в данном изобретении, включают, но не ограничиваются этим, *Drosophila Reaper & Grim*, который, как известно, вызывает апоптоз также в клетках млекопитающих [McCarthy, J. V & Dixit, V. M. Apoptosis induced by *Drosophila* reaper and grim in a human system. Attenuation by inhibitor of apoptosis proteins (cIAPs). *J. Biol. Chem.* 273, 24009-15 (1998)], и белки, которые активируют апоптоз, такие как CASP3 [Julien, O. & Wells, J. A. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* (2017). doi:10.1038/cdd.2017.44].

Другими предусмотренными белками летальности являются те, которые влияют на основные стадии раннего эмбриогенеза, такие как N-кадгерин, который экспрессируется на ранних стадиях гаструляции. Экспрессия доминантно-отрицательной формы этой молекулы адгезии приводит к ранней эмбриональной смертности.

Дополнительными белками летальности являются те, которые препятствуют важным сигнальным путям, таким как пути BMP и FGF. Сверхэкспрессия антагониста BMP4, например, ноггина, останавливает эмбриогенный процесс и приводит к ранней эмбриональной смертности.

В другом варианте осуществления первая последовательность нуклеиновой

кислоты может кодировать фермент эндонуклеазы, который может осуществлять редактирование генома, и функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей переключатель, который регулирует экспрессию белка эндонуклеазы, причем этот переключатель регулируется индуктором.

Примеры эндонуклеазных белков включают цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и систему CRISPR/Cas, которые дополнительно описаны в данном документе выше.

В этом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит нацеливающую последовательность (или направляющую последовательность), которая нацеливает эндонуклеазу на разрушение гена, который является существенным для выживания эмбриона. Таким образом, у эмбриона развивается летальный фенотип, и живой цыпленок (мужского пола) не может вылупиться из яйца.

Примеры существенных генов, которые можно разрушать, включают, но не ограничиваются этим, BMPR1A (Gene ID: 396308), BMP2 (Gene ID: 378779), BMP4 (Gene ID: 396165) и FGFR1 (Gene ID: 396516).

Агент для редактирования ДНК в соответствии с этим аспектом данного изобретения обычно содержит промотор, который функционально связан для управления экспрессией белка летальности или фермента эндонуклеазы.

Примеры промоторов, которые можно использовать в агенте для редактирования ДНК, включают, но не ограничиваются этим, промотор PGK лентивирусов, промотор CMV, промотор синапсина I человека (hSyn) и промотор CAG, как в экспрессионном векторе pCAGGS.

Промоторы и другие последовательности, которые регулируют экспрессию белка летальности или фермента эндонуклеазы, выбраны так, чтобы обеспечить достаточную экспрессию белка, чтобы придать фенотип летальности эмбрионам петушков.

Независимо от того, кодирует ли агент для редактирования ДНК эндонуклеазу или белок летальности, экспрессия этих эффекторных белков регулируется переключателем, который включен в агент для редактирования ДНК (например, кодируется им).

В контексте данного документа термин «переключатель» относится к одному компоненту или набору компонентов, которые действуют скоординированным образом, влияя на изменение, включающее все аспекты биологической функции, такие как активация, подавление, усиление или прекращение этой функции. В одном варианте осуществления переключатели относятся к индуцибельным и репрессируемым системам, используемым в регуляции генов. В общем случае индуцибельная система может быть

выключена в отсутствие некоторой молекулы или энергетической формы (называемой индуктором), которая обеспечивает возможность экспрессии генов. Говорят, что такая молекула «индуцирует экспрессию». Способ, которым это происходит, зависит от механизмов управления, а также от различий в типе клеток. Репрессируемая система включена всегда, за исключением случая наличия некоторой молекулы или энергетической формы (называемой корепрессором), которая подавляет экспрессию генов. Говорят, что такая молекула «подавляет экспрессию». Способ, которым это происходит, зависит от механизмов управления, а также от различий в типе клеток.

В контексте данного документа термин «индуцибельный» может охватывать все аспекты переключения независимо от привлеченного молекулярного механизма. Соответственно, переключатель в соответствии с изобретением может включать, но не ограничивается этим, индуцибельные системы на основе антибиотиков, индуцибельные системы на основе электромагнитной энергии, индуцибельные системы на основе малых молекул, индуцибельные системы на основе ядерных рецепторов и индуцибельные системы на основе гормонов. В некоторых вариантах осуществления переключатель может представлять собой систему, индуцируемую тетрациклином (Tet)/DOX, системы, индуцируемые светом, систему, индуцируемую абсцизовой кислотой (ABA), систему репрессора/оператора кумата, систему, индуцируемую 40НТ/эстрогеном, индуцибельные системы на основе экдизона или индуцибельную систему FKBP12/FRAP (комплекс FKBP12-рапамицин).

Понятно, что индуктор должен проникать в яйцо птицы. Кроме того, сам индуктор не должен быть токсичным или влиять на развитие эмбриона внутри яйца.

Типовые индукторы, предусмотренные в данном изобретении, включают, но не ограничиваются этим, температуру, ультразвук, электромагнитную энергию и химическое вещество. Индукторы можно применять к яйцу во время процесса образования яйца в теле курицы до яйцекладки.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления переключение индуцируется с помощью электромагнитной энергии (например, компонента видимого света). Компонент видимого света может иметь длину волны в диапазоне 450–700 нм или 450–500 нм, т. е. это синий свет. Синий свет может иметь интенсивность по меньшей мере 0,2 мВт/см² или по меньшей мере 4 мВт/см².

Компонент видимого света может иметь длину волны в диапазоне 620–700 нм, т. е. это красный свет.

Предусмотрены одно или несколько применений видимого света в любом порядке

и в любой комбинации. Видимый свет можно применять в виде одного или нескольких непрерывных применений или в виде импульсов (импульсное применение).

Примеры таких оптогенетических переключателей описаны в Muller et al., Biol Chem. 2015 Feb; 396(2):145-52. doi: 10.1515/hsz-2014-0199; Motta Mena et al., Nat Chem Biol. 2014 Mar; 10(3):196-202; и WO 2014018423, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления переключатель управляет экспрессией эффекторной молекулы, которая экспрессируется при включении переключателя с помощью индуктора. Типовые промоторы для управления экспрессией эффекторной молекулы включают, но не ограничиваются этим, промотор PGK лентивирусов, промотор рCAGG, промотор CMV, промотор EF1- α и промотор человеческого синапсина I (hSyn).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления эффекторная молекула представляет собой сайт-специфическую рекомбиназу.

Типовые оптогенетические переключатели проиллюстрированы на Фиг. 4A–C, в каждом из которых используются светочувствительные димеризующиеся белковые домены криптохрома 2 (CRY2) и CIB1 из *Arabidopsis thaliana* и сайт-специфическая рекомбиназа в качестве эффекторной молекулы. CRY2 слит в рамке считывания с одной половиной рекомбиназы Cre, тогда как CIB1 слит в рамке считывания с другой половиной рекомбиназы Cre, т. е. расщепленного рекомбиназного фермента. Таким образом, при наличии индуктора (синего света) CRY2 и CIB1 гетеродимеризуются с образованием функциональной Cre-рекомбиназы, которая способна осуществлять сайт-специфическую рекомбинацию.

Сайт-специфическая рекомбинация дополнительно описана в данном документе ниже.

Сайт-специфические рекомбиназы, Cre-рекомбиназа, полученная из бактериофага P1, и Flp-рекомбиназа, полученная из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, представляют собой сайт-специфические ДНК-рекомбиназы, каждая из которых распознает уникальную последовательность ДНК из 34 пар оснований (называемую «Lox» и «FRT» соответственно), а последовательности, которые фланкируются сайтами Lox или сайтами FRT, можно легко удалять с помощью сайт-специфической рекомбинации при экспрессии рекомбиназы Cre или Flp соответственно.

Кроме того, предусмотренные сайты распознавания рекомбиназы включают, но не ограничиваются этим, Lox511, Lox5171, Lox2272, m2, Lox71, Lox66, FRT, F1, F2, F3, F4, F5, FRT(LE), FRT(RE), attB, attP, attL и attR.

Например, последовательность Lox состоит из асимметричной спейсерной области из восьми пар оснований, фланкируемой инвертированными повторами из 13 пар оснований. Cre рекомбинирует ДНК-последовательность lox из 34 пар оснований, связываясь с инвертированными повторами из 13 пар оснований и катализируя расщепление и повторное лигирование цепи внутри спейсерной области. Ступенчатые разрезы ДНК, осуществляемые Cre в области спейсера, разделены 6 парами оснований, чтобы получить область перекрытия, которая действует как датчик гомологии, чтобы гарантировать, что рекомбинируют только сайты рекомбинации, имеющие одинаковую область перекрытия.

По существу, система на основе сайт-специфической рекомбиназы обеспечивает средства для удаления селективных кассет после гомологичной рекомбинации. Эта система также позволяет создавать условно измененные аллели, которые можно инактивировать или активировать временным или тканеспецифическим образом. Следует отметить, что рекомбиназы Cre и Flp оставляют после себя «шрам» Lox или FRT из 34 пар оснований. Остающиеся сайты Lox или FRT обычно остаются в интроне или 3' НТО модифицированного локуса, а современные данные свидетельствуют о том, что эти сайты обычно существенно не препятствуют функции гена.

Таким образом, рекомбинация Cre/Lox и Flp/FRT включает внесение нацеливающего вектора с 3' и 5' плечами гомологии, содержащего представляющую интерес мутацию, две последовательности Lox или FRT и, как правило, селективную кассету, помещенную между двумя последовательностями Lox или FRT. Применяют положительный отбор и идентифицируют гомологичные рекомбинанты, которые содержат целевую мутацию. Временная экспрессия Cre или Flp в сочетании с отрицательным отбором приводит к удалению селективной кассеты и позволяет осуществлять отбор клеток, в которых отсутствует кассета. Конечная целевая аллель содержит «шрам» Lox или FRT из экзогенных последовательностей. Типовой нацеливающий вектор, в котором используется рекомбинация Cre/Lox, проиллюстрирован на Фиг. 4А и С. Типовой нацеливающий вектор, в котором используется рекомбинация Flp/FRT, проиллюстрирован на Фиг. 4В.

Предусмотрены другие способы активации энергией, в частности, энергией электрического поля и/или ультразвуком, которые имеют аналогичный эффект. При необходимости пары белков переключателя можно менять и/или модифицировать для максимального эффекта при применении другого источника энергии.

Энергию электрического поля предпочтительно применяют, по существу, как

описано в данной области техники, используя один или более электрических импульсов от около 1 В/см до около 10 кВ/см в условиях *in vivo*. Вместо или в дополнение к импульсам электрическое поле можно применять непрерывно. Электрический импульс можно подавать в течение от 1 до 500 миллисекунд, предпочтительно от 1 до 100 миллисекунд. Электрическое поле можно прикладывать непрерывно или импульсно в течение около 5 минут. В контексте данного документа термин «энергия электрического поля» представляет собой электрическую энергию, которой воздействуют на клетку. Предпочтительно электрическое поле имеет напряженность от около 1 В/см до около 10 кВ/см или более в условиях *in vivo* (смотрите WO97/49450).

В контексте данного документа термин «электрическое поле» включает один или более импульсов при переменных емкости и напряжении, включая экспоненциальную и/или прямоугольную, и/или модулированную, и/или модулированную прямоугольную формы волны. Ссылки на электрические поля и электричество следует понимать как включающие ссылку на наличие разности электрических потенциалов в среде ячейки. Такая среда может быть создана посредством статического электричества, переменного тока (AC), постоянного тока (DC) и т. д., Как известно в данной области техники. Электрическое поле может быть однородным, неоднородным или иным, и может изменяться по силе и/или направлению в зависимости от времени.

Также возможны одно или несколько применений электрического поля, а также одно или несколько применений ультразвука в любом порядке и в любой комбинации. Ультразвук и/или электрическое поле можно применять в виде одного или нескольких непрерывных применений или в виде импульсов (импульсное применение).

Следует отметить, что можно использовать альтернативный подход, в котором активирующий фермент (например, фермент рекомбиназа, такой как, например, Cre) отделяют от кассеты гена летальности. В этом случае активирующий фермент вставляется в геном самца или самки птицы, а неактивная кассета летальности вставляется в Z-хромосому птицы соответствующего пола. В этом случае активацию летальности в мужских эмбрионах осуществляют просто путем скрещивания двух трансгенных родителей.

Таким образом, в соответствии с другим аспектом данного изобретения предложена система для редактирования ДНК, содержащая:

(i) первый агент, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты для обеспечения летального фенотипа 10 в яйце птицы, функционально связанную с сайтом распознавания рекомбиназы, и последовательность для направления указанной

первой последовательности нуклеиновой кислоты для осуществления действия указанного летального фенотипа на Z-хромосому клетки птицы; и

(ii) второй агент, содержащий вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует фермент рекомбиназы, и последовательность для направления указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты на Z-хромосому клетки птицы.

Агенты и системы для редактирования ДНК по данному изобретению могут также содержать репортерный ген, который кодирует репортерный полипептид, который можно легко обнаружить по его присутствию или активности, включая, но не ограничиваясь этим, люциферазу, флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, бета-галактозидазу, секретируемую плацентарную щелочную фосфатазу, бета-лактамазу, человеческий гормон роста и другие секретируемые ферментные репортеры. В общем случае репортерный ген кодирует полипептид, который в ином случае не вырабатывается клеткой-хозяином, и который можно обнаружить с помощью анализа клетки(ок), например, прямого флуорометрического, радиоизотопного или спектрофотометрического анализа клетки(ок), и, как правило, без необходимости убивать клетки для анализа сигнала. В некоторых случаях репортерный ген кодирует фермент, который вызывает изменение флуорометрических свойств клетки-хозяина, которое можно обнаружить по качественной, количественной или полуколичественной функции или активации транскрипции. Типовые ферменты включают эстеразы, бета-лактамазу, фосфатазы, пероксидазы, протеазы (тканевый активатор пламиногена или урокиназу) и другие ферменты, функции которых можно обнаружить с помощью соответствующих хромогенных или флуорогенных субстратов, которые известны специалистам в данной области техники или будут разработаны в будущем. Репортерный ген может свидетельствовать об успешной интеграции конструкции в Z-хромосому.

Другие компоненты агента для редактирования ДНК включают саморасщепляющиеся пептиды, такие как 2A, включая, но не ограничиваясь этим, P2A, T2A, E2A (Wang et al., Scientific Report 5, Article 16273 (2015), или последовательности сайта внутренней посадки рибосомы (IRES).

Агент для редактирования ДНК можно конструировать в виде вирусного вектора (используя один вектор или несколько векторов). Такие векторы обычно используют в применениях для переноса генов и генной терапии. Разные вирусные векторные системы имеют свои уникальные преимущества и недостатки. Вирусные векторы, которые можно

использовать для интеграции первой последовательности нуклеиновой кислоты по данному изобретению в Z-хромосому, включают, но не ограничиваются этим, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, альфавирусные векторы, векторы на основе вируса простого герпеса и ретровирусные векторы, более подробно описанные ниже. В соответствии с конкретным вариантом осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор.

Вирусная конструкция, такая как ретровирусная конструкция содержит по меньшей мере один элемент промотора/энхансера транскрипции или определения локуса, или другие элементы, которые иным образом управляют экспрессией генов, таким как альтернативный сплайсинг, экспорт ядерной РНК или посттрансляционная модификация матричной РНК. Такие векторные конструкции также содержат сигнал упаковки, длинные концевые повторы (ДКП) или их фрагменты и сайты связывания праймера положительной и отрицательной цепей, соответствующие используемому вирусу, если он уже не присутствует в вирусной конструкции. Кроме того, такая конструкция, как правило, содержит сигнальную последовательность для секреции пептида из клетки-хозяина, в которую он внесен. Предпочтительно для этой цели сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность млекопитающего или сигнальную последовательность полипептидных вариантов некоторых вариантов осуществления изобретения. Необязательно, конструкция также может содержать сигнал, который управляет полиаденилированием, а также один или несколько сайтов рестрикции и последовательность терминирования трансляции. В качестве примера, такие конструкции, как правило, содержат 5'-ДКП, сайт связывания тРНК, сигнал упаковки, точку начала синтеза второй цепи ДНК и 3'-ДКП или их фрагмент. Можно использовать другие векторы, которые не являются вирусными, такие как катионные липиды, полилизин и дендримеры.

Предпочтительно, кодоны, кодирующие белки агента для редактирования ДНК, представляют собой «оптимизированные» кодоны, то есть кодоны, которые часто встречаются, например, в генах с высокой экспрессией у птиц, вместо тех кодонов, которые часто используются, например, в вирусе гриппа. Такая частота использования кодонов обеспечивает эффективную экспрессию белка в клетках птиц. Из литературы известны профили частоты использования кодонов для высокой экспрессии генов многих видов (например, Nakamura et al, 1996; Wang et al, 1998; McEwan et al. 1998).

Как уже упоминалось, агент (или систему) для редактирования ДНК используют для создания курочек, которые способны производить жизнеспособных потомков женского пола и нежизнеспособных потомков мужского пола.

В качестве первого этапа агент для редактирования ДНК вносят в примордиальные зародышевые клетки птицы или непосредственно в сперматозоиды птицы.

Подходы для внесения представляющих интерес нуклеиновых кислот в реципиентные клетки известны и включают липофекцию, трансфекцию, микроинъекцию, электропорацию, трансформацию и микропроектирование и т. д.

Таким образом, в соответствии с другим аспектом данного изобретения предложена популяция клеток, 5 содержащая клетки (например, примордиальные зародышевые клетки или гаметы) птицы, которые содержат экзогенный полинуклеотид, который стабильно интегрирован в Z-хромосомы клеток, причем указанный экзогенный полинуклеотид, предназначенный для обеспечения (например, индуцибельным образом) летального фенотипа для мужского потомства птицы (но не для женского потомства птицы).

В контексте данного документа термины «примордиальные зародышевые клетки» и «ПЗК» относятся к диплоидной клетке, 10 присутствующей в ранних эмбрионах, которая может дифференцироваться/развиться в гаплоидные гаметы (т. е. сперматозоиды и яйцеклетки) в организме взрослой птицы. Примордиальные зародышевые клетки можно выделять на разных стадиях развития и из разных участков развивающегося эмбриона птицы, как известно специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, генитальный гребень, развивающуюся гонаду, кровь и герминальное полулуние. Смотрите, например, Chang et al., Cell Biol Int 21:495-9, 1997; Chang et al., Cell Biol Int 19:143-9, 1995; Alloli et al., Dev Biol 165:30-7, 1994; Swift, Am J Physiol 15:483-516; и международную публикацию согласно РСТ № WO 99/06533. Генитальный гребень является частью развивающегося эмбриона, известной специалисту в данной области техники. Смотрите, например, Strelchenko, Theriogenology 45: 130-141, 1996; Lavoie, J Reprod Dev 37: 413-424, 1994. Как правило, ПЗК окрашиваются положительно в методе реакции Шифф-иодная кислота (ШИК). В нескольких видах ПЗК можно идентифицировать, используя антитело против SSEA (одно примечательное исключение составляют индейки, ПЗК от которых не представляют антиген SSEA). В данной области техники известны различные методы выделения и очистки ПЗК, включая концентрирование ПЗК из крови с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколл (Yasuda et al., J Reprod Fertil 96:521-528, 1992).

Получение культуры ПЗК *in vitro* возможно при применении среды, содержащей куриную и бычью сыворотку, кондиционированную среду, питающие клетки и факторы роста, такие как FGF2 (van de Lavoie et al. 2006, Nature 441:766-769).

doi:10.1038/nature04831); Choi et al. 2010, PLoS ONE 5:e12968. doi:10.1371/journal.pone.0012968; MacDonald et al. 2010. PLoS ONE 5:e15518. doi:10.1371/journal.pone.0015518). Недавно было показано, что питательную замещающую среду, содержащую факторы роста для активации сигнальных путей FGF, инсулина и TGF- β , можно использовать для размножения ПЗК (Whyte et al. 2015, Stem Cell Rep 5:1171-1182. doi:10.1016/j.stemcr.2015.10.008). Кроме того, в этой работе применение овотрансферрина в качестве заместителя железосодержащих белков, присутствующих в птичьей сыворотке, позволило осуществить размножение ПЗК в отсутствие питающих клеток и сыворотки, при этом клетки сохраняют высокую скорость пролиферации.

Примордиальные зародышевые клетки (ПЗК) можно получать и готовить для осуществления раскрытого предмета изобретения любым подходящим способом и, при необходимости, хранить, замораживать, культивировать и т. п. перед использованием. Например, примордиальные зародышевые клетки можно получать из донорских эмбрионов на соответствующей эмбриональной стадии. Стадии развития птиц описываются в данном документе с помощью одной из двух общепринятых в данной области техники систем стадирования: системы Эйял-Гилади и Кохава (EG&K; смотрите Eyal-Giladi & Kochav, Dev Biol 49:321-327, 1976), в которой используются римские цифры для обозначения стадий развития первичных полосок, и системы стадирования Гамбургера и Гамильтона (H&H; смотрите, например, Hamburger & Hamilton, J Morphol 88:49-92, 1951), в которой используются арабские цифры для обозначения этапов после яйцекладки. Если не указано иное, стадии, упомянутые в данном документе, являются стадиями по системе стадирования H&H.

Например, ПЗК можно выделять на стадии 4 или на стадии герминального полулуния, до стадии 30, причем клетки получают из крови, генитального гребня или гонады на более поздних стадиях. Примордиальные зародышевые клетки в общем случае в два раза больше соматических клеток и их легко отличить и отделить от них по размеру. Мужские (или гомогаметные) примордиальные зародышевые клетки (ZZ) можно отличить от гетерогаметных примордиальных зародышевых клеток (ZW) любым подходящим способом, таким как получение половых клеток от конкретного донора и типирование других клеток от этого донора, причем полученные клетки имеют тот же хромосомный тип, что и типированные клетки.

Альтернативой использованию ПЗК является прямая трансфекция сперматозоидов с применением агента для редактирования ДНК, раскрытого в данном документе; смотрите, например, Cooper et al., 2016 Transgenic Res 26:331-347, doi:10.1007/s11248-016-

0003-0.

Для получения химерных птиц из ПЗК, отредактированных *in vitro*, экзогенные отредактированные клетки внутривенно вводят в суррогатные эмбрионы-хозяев на стадии, когда их эндогенные ПЗК мигрируют к генитальному гребню. «Донорские» ПЗК могут быть того же вида, что и суррогатный эмбрион-хозяин, или другого вида. Отредактированные «донорские» ПЗК должны оставаться жизнеспособными и, в одном варианте осуществления, вытеснять эндогенные ПЗК, если они должны колонизировать формирующуюся гонаду и передавать отредактированную(ые) хромосому(ы) через зародышевую линию. Чтобы обеспечить донорским ПЗК преимущество, количество эндогенных ПЗК можно уменьшать путем химической или генетической абляции (Smith et al. 2015, *Andrology* 3:1035-1049. doi:10.1111/andr.12107). Было показано, что обработка бластодермы суррогатных эмбрионов эмульгированным бусульфаном увеличивает передачу зародышевой линии донорских ПЗК до более чем 90%, хотя эта скорость значительно падает, если ПЗК культивировать или криоконсервировать (Nakamura et al. 2008, *Reprod Fertil Dev* 20:900-907. doi:10.1071/RD08138; Naito et al. 2015, *Anim Reprod Sci.* 153:50-61. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.12.003). Другие способы изменения соотношения отредактированных ПЗК и собственных ПЗК описаны в заявке США № 20060095980.

Необязательно, ПЗК можно трансплантировать во взрослые гонады, как известно в данной области техники, смотрите, например, Trefil et al., 2017 *Sci Rep*, Oct 27;7(1):14246 doi: 10.1038/s41598-017-14475-w.

Генетически модифицированные клетки (например, ПЗК) можно готовить для введения другим птицам путем диссоциации клеток (например, путем механической диссоциации) и тщательного смешивания клеток с фармацевтически приемлемым носителем (например, фосфатно-солевым буферным раствором). Примордиальные зародышевые клетки в одном варианте осуществления представляют собой примордиальные зародышевые клетки гонад, а в другом варианте осуществления – примордиальные зародышевые клетки крови («гонада» или «кровь» относятся к происхождению ткани в исходном эмбриональном доноре). Вводимые примордиальные зародышевые клетки могут быть гетерогаметными (Zw) или гомогаметными (ZZ). ПЗК можно вводить в физиологически приемлемом носителе, в одном варианте осуществления при pH от около 6 до около 8 или 8,5, в подходящем количестве для достижения необходимого эффекта (например, от 100 до 30000 ПЗК на эмбрион). ПЗК можно вводить без других ингредиентов или клеток, или же другие клетки и ингредиенты можно вводить

вместе с ПЗК.

Введение примордиальных зародышевых клеток животному-реципиенту *in ovo* можно осуществлять в любое подходящее время, когда ПЗК все еще могут мигрировать в развивающиеся гонады. В одном варианте осуществления введение проводят, начиная приблизительно со стадии IX в соответствии с системой стадирования Эйял-Гилады и Кохава (EG&K) и приблизительно до стадии 30 в соответствии с системой стадирования эмбрионального развития Гамбургера и Гамильтона, а в другом варианте осуществления – на стадии 15. Таким образом, для цыплят время введения соответствует 1, 2, 3 или 4 суткам эмбрионального развития: в одном варианте осуществления – от 2 до 2,5 суток. Введение, как правило, осуществляют путем инъекции в любой подходящий целевой участок, такой как область, определяемая амнионом (включая эмбрион), желточным мешком и т. д. В одном варианте осуществления осуществляют инъекцию в сам эмбрион (включая стенку тела эмбриона), а в альтернативных вариантах осуществления можно применять интраваскулярную или интрацеломическую инъекцию в эмбрион. В других вариантах проводят инъекцию в сердце. Способы раскрытого изобретения можно проводить с предварительной стерилизацией птицы-реципиента *in ovo* (например, путем химической обработки с применением бусульфана или путем гамма- или рентгеновского облучения). В контексте данного документа термин «стерилизация» относится к частичной или полной неспособности вырабатывать гаметы, полученные из эндогенных ПЗК. Когда донорские гаметы получают от такого реципиента, их можно получать в виде смеси с гаметами донора и реципиента. Эту смесь можно использовать непосредственно или же смесь можно дополнительно обрабатывать для обогащения доли донорских гамет в ней.

Введение примордиальных зародышевых клеток *in ovo* можно осуществлять любым подходящим способом, вручную или автоматически. В одном варианте осуществления введение *in ovo* осуществляют путем инъекции. Механизм введения *in ovo* не является критическим, но он не должен чрезмерно повреждать ткани и органы эмбриона или окружающие его внезародышевые мембраны так, чтобы обработка не приводила к чрезмерному снижению уровня вылупливания. Для этой цели подходит шприц для подкожных инъекций, снабженный иглой около 18–26 калибра. Можно использовать вытянутую стеклянную пипетку с отверстием диаметром около 20–50 микрон. В зависимости от точной стадии развития и положения эмбриона однодюймовая игла будет попадать в жидкость над цыпленком или в самого цыпленка. Направляющее отверстие можно пробивать или просверливать в скорлупе до введения иглы, чтобы

предотвратить повреждение или затупление иглы. При необходимости яйцо можно герметизировать по существу непроницаемым для бактерий герметизирующим материалом, таким как воск и т. п., для предотвращения последующего проникновения нежелательных бактерий. Предполагается, что высокоскоростная инъекционная система для птичьих эмбрионов в особенности подойдет для осуществления раскрытого изобретения. Все такие устройства, адаптированные для практической реализации способов, раскрытых в данном документе, содержат инжектор, содержащий состав примордиальных зародышевых клеток, описанных в данном документе, причем инжектор предназначен для инъекции в яйцо, проводимой устройством в соответствующем месте внутри яйца. Кроме того, может быть предусмотрено устройство для герметизации, функционально соединенное с устройством для инъекций, для герметизации отверстия в яйце после инъекции в него. В другом варианте осуществления можно использовать вытянутую стеклянную микропипетку для введения ПЗК в подходящее место внутри яйца, например, непосредственно в кровоток, либо в вену или артерию, либо непосредственно в сердце.

После инъекции яиц модифицированными ПЗК, химерный эмбрион инкубируют до вылупливания. Он вырастает до половой зрелости, при этом химерная птица вырабатывает гаметы, полученные из донорских ПЗК.

Гаметы (яйцеклетки или сперматозоиды) из химер (или из материала, с которым проводили непосредственные генетические манипуляции, как описано в данном документе выше) затем используются для выращивания кур-родоначальниц (F1). Методы молекулярной биологии, известные в данной области техники (например, ПЦР и/или Саузерн-блот), можно использовать для подтверждения передачи зародышевой линии. Кур F1 можно обратно скрещивать для создания гомозиготных ZZ самцов-носителей и самок-носительниц (F2).

Затем гаметы от кур-родоначальниц F2 можно использовать для расширения племенных колоний. Колонии обычно выращивают до половой зрелости. Фертильные яйца, полученные от этих стай, можно тестировать в отношении ранней эмбриональной смертности самцов путем воздействия индуктора, который обеспечивает летальный фенотип (например, освещения синим светом). После индукции яйца инкубируют (например, в течение 8 суток) и проводят скрининг (например, путем просвечивания) для выявления ранней эмбриональной смертности.

Ожидается, что в течение срока действия патента, полученного на основании этой заявки, будет разработано много релевантных инструментов для редактирования ДНК, и

предполагается, что термин «агент для редактирования ДНК» априори включает все такие новые технологии.

В контексте данного документа термин «около» относится к $\pm 10\%$.

Термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеющий» и их сочетания означают «включающий, но не ограниченный этим».

Термин «состоящий из» означает «включающий и ограниченный этим».

Термин «состоящий преимущественно из» означает, что композиция, способ или структура могут включать дополнительные ингредиенты, этапы и/или части, но только в том случае, если дополнительные ингредиенты, этапы и/или части не приводят к существенному изменению основных и новых характеристик заявленных композиции, способа или структуры.

В контексте данного документа форма единственного числа включает отсылки к множественному числу, если 10 из контекста четко не следует иное. Например, термин «соединение» или «по меньшей мере одно соединение» может включать некоторое количество соединений, включая их смеси.

В тексте данной заявки различные варианты осуществления этого изобретения могут быть представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено исключительно для удобства и краткости и не должно рассматриваться как негибкое ограничение объема изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона явным образом раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как явным образом раскрывающее поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числовые значения в этом диапазоне, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо независимо от ширины диапазона.

Каждый раз, когда в данном документе указан числовой диапазон, подразумевается, что он включает любое перечисленное числовое значение (дробное или целое) в указанном диапазоне. Выражения «в диапазоне/диапазонах между» первым указанным числом и вторым указанным числом и «в диапазоне/диапазонах от» первого указанного числа «до» второго указанного числа взаимозаменяемо используются в данном документе и включают первое и второе указанные числа и все дробные и целые числа между ними. В контексте данного документа термин «способ» относится к процессам, средствам, технологиям и процедурам для выполнения данной задачи, включая, но не ограничиваясь этим, те процессы, средства, технологии и процедуры,

которые известны или которые легко разработать на основе известных процессов, средств, технологий и процедур, применяемых практикующими специалистами в области химии, фармакологии, биологии, биохимии и медицины.

Понятно, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть обеспечены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть обеспечены отдельно или в любой подходящей подкомбинации или как подходящие в любом другом описанном варианте осуществления изобретения. Определенные признаки, описанные в контексте различных вариантов осуществления, не следует рассматривать как существенные признаки этих вариантов осуществления, если только вариант осуществления не функционирует без этих элементов.

Различные варианты осуществления и аспекты данного изобретения, описанные выше и заявленные в формуле изобретения ниже, экспериментально подтверждаются в нижеприведенных примерах.

ПРИМЕРЫ

Далее текст ссылается на нижеприведенные примеры, которые вместе с вышеприведенным описанием иллюстрируют некоторые варианты осуществления изобретения неограничивающим образом.

В общем случае номенклатура, используемая в данном документе, и лабораторные процедуры, применяемые в данном изобретении, включают молекулярные, биохимические, микробиологические методы и технологии рекомбинантных ДНК. Такие технологии подробно описаны в литературе. Смотрите, например, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методологии, приведенные в патентах США №№ 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology"

Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); доступные методы иммуноанализа подробно описаны в патентной и научной литературе, смотрите, например, патенты США №№ 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) и "Methods in Enzymology" Vol. 1317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); которые все включены посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены в данном документе. Другие общие ссылки приведены в тексте этого документа. Считается, что упоминаемые в них процедуры хорошо известны в данной области техники и приведены для удобства читателя. Вся содержащаяся в них информация включена в данный документ посредством ссылки.

Рабочий процесс

Создание линии кур с модифицированным геномом представляет собой многоэтапный процесс. Конечным результатом является линия кур-несушек, которая по содержанию генома полностью идентична несушкам, которых в настоящее время используют в промышленности. Аналогичным образом, конечный продукт, который представляет собой бесплодное яйцо, используемое в пищу, будет идентичным – смотрите Фиг. 1.

Рабочий процесс состоит из 5 основных этапов:

1. Создание и культивирование куриных линий примордиальных зародышевых клеток (ПЗК).
2. Модификация генома в культивируемых ПЗК.
3. Трансплантация модифицированных ПЗК в эмбрионы и получение химерных цыплят, среди которых проведут скрининг в отношении потенциальных носителей.
4. Разведение кур-родоначальниц из генетического материала, полученного от химер.

5. Расширение колоний кур-родоначальниц до стай-родоначальниц и повторная проверка передачи зародышевой линии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуральная среда для ПЗК: Культуральная среда для птичьих ПЗК состоит из безкальциевой среды DMEM (Gibco), разведенной водой до 250 мОсмол/л, содержащей 12,0 мМ глюкозы, 2,0 мМ GlutaMax (Gibco), 1,2 мМ пирувата (Gibco), 1 х витамина MEM (Gibco), 1 х B-27 добавки (Gibco), 1 х NEAA (Gibco), 0,1 мМ P-меркаптоэтанола (Gibco), 1 х нуклеозидов (Biological industries), 0,2% овальбумина (Sigma), 0,1 мг/мл гепарина натрия (Sigma), 0,15 мМ CaCl₂ (Sigma), 1 х витамина MEM (Gibco), 1 х пенициллина/стрептомицина (Biological Industries), 0,2 % куриной сыворотки (Sigma) в птичьей DMEM. Перед применением добавляли следующие факторы роста: человеческий активин A, 25 нг/мл (Peprotech); человеческий FGF2, 4 нг/мл (R&D Biosystems), овотрансферрин (5 пг/мл) (Sigma). AkoDMEM относится к разбавленной среде, содержащей глюкозу, пируват и витамины.

Получение линии ПЗК: Линии ПЗК получали путем добавления ~ 1,0–3,0 пл крови, выделенной из эмбрионов на 15–16 стадии (H&H), в 300 пл среды в 48-луночном планшете. Среду меняли каждые 2 суток. Когда общее число клеток достигало 1×10^5 , общий объем среды меняли каждые 2 суток и размножали клетки при $2-4 \times 10^5$ клеток/мл среды. Клетки замораживали в культуральной среде для ПЗК, содержащей 10% ДМСО, температуру постепенно снижали до -80 °С, хранили в течение 1–3 суток и переносили в жидкий азот.

Определение пола и характеристика линии ПЗК: Характеристики каждой линии ПЗК изучали в отношении определения пола, экспрессии мРНК маркеров ПЗК и экспрессии белка известного маркера ПЗК SSEA1⁴. ДНК донорского эмбриона выделяли и хранили для дальнейшего использования. Для определения пола получали ДНК из $2-4 \times 10^5$ клеток ПЗК, ресуспендировали в хвостовом буфере (102-T, Viagen), содержащем 100 пг/мл протеиназы К (Sigma), и инкубировали при 55 °С в течение 3 часов. Протеиназу К инактивировали при 85 °С в течение 45 минут. ПЦР для определения пола проводили с праймерами из W-хромосомы, которые нацелены на женскую хромосому (P17, P18) и рибосомальный S18 (P19, P20) в качестве контроля⁶. Для анализа экспрессии генов РНК очищали, используя реагент TRIZOL, а 1 пг РНК использовали для получения библиотеки кДНК с помощью реакции ПЦР с обратной транскрипцией (обратная транскриптаза от GoScript, Promega). кДНК служила матрицей для ПЦР с применением праймеров Dazl, Sox2, cPouV, Nanog, Klf4, cVH-праймеров, P21-P22, P23-P24, P25-P26, P27-P28, P29-P30,

P31-P32 соответственно.

Иммуногистохимия с антителом против SSEA1: Клетки собирали, фиксировали 4% ПФА, блокировали 5% нормальной козьей сывороткой в 0,1% ФСБ-тритон и окрашивали при разведении 1:100 антитела против SSEA1 (DSHB, Hybridoma bank¹³) в блокирующем буфере в течение ночи. После промывки клеток в течение 30 минут 0,1% ФСБ-тритон добавляли вторичное антитело (Alexa Fluor 488, molecular probes) в течение 1 часа, клетки окрашивали ДАФИ (Sigma), заключали в гистологическую среду (Histomount, electron microscopy sciences) и покрывали.

Трансфекция ПЗК, отбор и сортировка методом FACS: Плазмидную трансфекцию ПЗК осуществляли, используя липофекцию или электропорацию. Для липофекции использовали липофектамин 2000 в соответствии с протоколом производителя. $3-5 \times 10^5$ клеток высевали в 96-луночный планшет в AcoDMEM, содержащую NEAA, пируват, витамины, CaCl₂ и факторы роста (активин А, hFGF и овотрансферрин). 100 нг плазмид и 0,25 мкл липофектамина 2000 (invitrogen) разводили отдельно в 20 пл смеси OPTI-MEM, смешивали вместе, инкубировали в течение 20 минут и пипетировали на клетки. Для электропорации 5×10^5 или $1,5 \times 10^6$ клеток промывали в AcoDMEM и подвергали электропорации при 1000 В, 12 мс, 3 импульсах на электропораторе Neon (Invitrogen) и сразу же высевали в 96- или 48-луночный планшет соответственно в среду для ПЗК без антибиотиков. Среду меняли через 1–3 часа. Отбор с помощью 25–100 пг/мл G418 начинали через 72 часа и проводили в течение 2–4 недель. После отбора клетки индивидуально выделяли вручную или с помощью сортировки методом FACS. Для сортировки методом FACS проводили аккуратное пипетирование клеток и сортировку клеток в культуральной среде для ПЗК. ЗФБ-положительные клетки сортировали методом FACS Aria II в новый 96-луночный планшет, по одной клетке на лунку, или объединяли. (Анализ FACS выполняли, используя проточный цитометр BD FACS Aria II (BD, USA).

Получение плазмид:

Клонирование плазмид CRISPR: последовательности CRISPR конструировали, используя инструмент для конструирования CRISPR от Zhang lab, MIT ([www\(точка\)crispr\(точка\)mit\(точка\)edu](http://www.crispr.mit.edu))⁹. Плазмиду px330-GFP (модифицированную из плазмиды Addgene # 42230)¹⁴ разрезали, используя рестрикционный фермент BbsI, и она служила в качестве остова для вставки сайта CRISPR с образованием онРНК. Олигонуклеотиды для сайтов CRISPR онРНК – CRISPR1, CRISPR3 (олигонуклеотиды P34-P35 и P36-P37 соответственно) денатурировали при 95 °C в течение 30 секунд,

медленно отжигали и лигировали в разрезанные BbsI плазмиды, трансформировали в E.coli, очищали и верифицировали последовательность, как описано в [mediadotaddgenedotorg/cms/filer_public/e6/5a/e65a9ef8-c8ac-4f88-98da-3b7d7960394c/zhang-lab-general-cloning-protocoldotpdf; и Cong L, et al., Science. 2013 Jan 3.10.1126/science.1231143 PubMed 23287718].

Клонирование плазмиды pJet-НА: геномную область за локусом HINTZ в Z-хромосоме, содержащую как 5' ПГ, так и 3' ПГ, амплифицировали из ДНК ПЗК с праймерами P1 и P2 с помощью ПЦР (Кара, Roche). Продукт ПЦР очищали и лигировали в плазмиду pJet1.2 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя.

Конструирование нацеливающего вектора: Плазмиду pCAGG-IRES-Neo-GFP использовали в качестве матрицы для ПЦР, используя праймеры P5-P6 для амплификации вставки pCAGG-IRES-Neo-GFP. Плазмиду pJet-НА использовали в качестве матрицы для ПЦР, используя праймеры P3-P4, для амплификации вектора, содержащего 5' ПГ и 3' ПГ (Фиг. 3). Реакцию сборки Гибсона проводили для очищенного вектора и продуктов ПЦР-вставки, взяв 0,03 пм и 0,06 пм линейаризованного продукта соответственно. Продукты реакции сборки Гибсона¹⁰ трансформировали в E.coli для получения плазмиды, последовательность которой верифицировали.

Конструирование вектора pCAGG-Optogene

Для создания вектора pCAGG-Optogene в качестве матрицы для амплификации оптогенов использовали плазмиды оптогенов pmCherry-CIBN-CreC и pmCherry-Cry2-CreN¹¹, используя праймеры P40-P41 и P42-P43, которые давали продукты размером 1,3 т. п. о. и 2,1 т. п. о. соответственно. Эти два продукта имеют общие перекрывающиеся последовательности в сайте P2A, который был внесен в праймеры P41 и P42. Один цикл ПЦР с удлинением для выступа использовали для объединения двух фрагментов в один 3,5 т. п. о. продукт, который очищали от агарозного геля. Этот продукт лигировали в челночный вектор pJet1.2, который использовали в качестве матрицы для ПЦР, используя праймеры P44 и P45, которые содержат хвосты с сайтами рестрикции SmaI и NheI соответственно. Этот продукт расщепляли, используя соответствующие рестрикционные ферменты, и использовали в качестве вставки для лигирования в расщепленную SmaI и NheI плазмиду pCAGG-IRES-GFP, которая служила вектором. Продукты лигирования трансформировали в бактерии E.coli, и проводили верификацию последовательности размноженной плазмиды.

Конструирование вектора pGK-DTA-IRES-GFP

Для создания pGK-DTA-IRES-GFP экспрессионный вектор pSK BS-PGK-DTA

использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами P46 и P47, которые содержат последовательности удлинения для сайтов рестрикции XmaI и NheI соответственно. Продукт размером 0,65 т. п. о. расщепляли соответствующими ферментами и использовали в качестве вставки для лигирования в комплементарный сайт XmaI-NheI в плазмиде pGK-IRES-GFP, которая служила вектором для лигирования. Продукты лигирования трансформировали в бактерии *E. coli*, и проводили верификацию последовательности размноженной плазмиды.

Электропорация *in ovo*: Электропорацию *in ovo* проводили по существу так, как было описано ранее⁷. Оплодотворенные яйца инкубировали в течение 56–60 ч при 37,8 °C, делали окно в яичной скорлупе и вводили плазмидную ДНК в концентрации ~ 2 пг/мкл с помощью заостренной микропипетки с отверстием диаметром 10–15 пм в нервную трубку. Подавали три импульса по 25 В в течение 30 мс, используя систему электропорации с прямоугольной волной ECM 830 (BTX). После электропорации яичную скорлупу герметизировали парафильмом и продолжали инкубировать эмбрионы до анализа.

Эндонуклеазный анализ: ПЗК трансфицировали плазмидами CRISPR1 или CRISPR3, используя реагент липофектамин 2000. Через сорок восемь часов отдельные ЗФБ-положительные клетки выделяли в 96-луночный планшет и выращивали для образования чистых колоний. Получали ДНК и проводили ПЦР-амплификацию 350 п. о. области, фланкирующей сайты CRISPR с праймерами P38-P39. Продукты ПЦР подвергали денатурации при 95 °C, медленно отжигали и инкубировали с эндонуклеазой T7 в течение 1 часа при 37 °C. В целях калибровки и в качестве положительного контроля 350 п. о. продукт ПЦР субклонировали в pJet1.2, а сайт CRISPR мутировали, используя сайт-направленный мутагенез. Введенная мутация меняла последовательность ДТ ATACCAGATAACGTgCCTTATTTGGCCGTT (SEQ ID NO: 2) на ATACCAGATAACGTaatCCTTATTTGGCCGTT (SEQ ID NO: 3). Эта искусственная мутация служила в качестве положительного контроля как для эндонуклеазного анализа (Фиг. 7A), так и для контрольного секвенирования (Фиг. 8B).

Саузерн-блоттинг: Метку Dig для генных зондов 5' ПГ, 3' ПГ и Neo получали с помощью ПЦР-амплификации (Longamp, NEB) с праймерами P13-P14, P15-P16 и P11-P12, соответственно, используя смесь для мечения ДНК DIG (Roche). 15 пг геномной ДНК расщепляли в течение ночи при 37 °C с помощью рестрикционного фермента BglII. Фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в 0,8% (мас./об.) агарозном геле (20 В, 12 ч) и переносили на положительно заряженные нейлоновые мембраны (GE

Healthcare). После переноса влажные мембраны сшивали, используя УФ-свет на 254 нм в течение 3 минут с каждой стороны, затем промывали 2XSSC. Мембраны предварительно гибридизировали в течение 2 часов при 42 °C, используя гибридизационный раствор DIG Easy-Hyb (Roche). Зонды (50 нг/мл) денатурировали нагреванием до 95 °C в течение 5 минут и сразу же погружали в лед. Денатурированные зонды добавляли к 10 мл теплого раствора DIG Easy-Hyb и гибридизировали в течение 12 часов при 42 °C. Мембраны дважды промывали в течение 10 минут в 2XSSC, 0,1% ДСН при комнатной температуре с перемешиванием, а затем 3 раза промывали в течение 30 минут в 0,2XSSC, 0,1% ДСН при 65 °C с перемешиванием. Дополнительную промывку и блокирование осуществляли с помощью промывочного раствора DIG и набора блокирующих буферов (Roche) в соответствии с их протоколом. Обнаружение метки DIG проводили, используя антитело против дигоксигенина-AP 1:10000 (Roche) с последующей хемилюминесцентной реакцией с применением реагента CDP-Star (Roche). Изображения получали, используя систему гель-визуализации G:BOX (Syngene).

Введение ПЗК в эмбрионы и окрашивание всего препарата: Свежеотложенные яйца инкубировали заостренным концом вверх в течение 58–62 часов при 37,8 °C с влажностью 55%. После инкубации открывали 48 мм окно в скорлупе яйца и вводили в кровоток 3000–8000 ПЗК с помощью заостренной микропипетки с отверстием ~ 30–40 пм. Окно покрывали белой яичной скорлупой и дополнительно герметизировали парафильмом (Parafilm) или лейкопластом (BSN medical GmbH). Эмбрионы инкубировали до вылупливания. Выделяли некоторые гонады инъецированных эмбрионов и брали для окрашивания всего препарата ЗФБ. Гонады фиксировали в 4% ПФА, промывали в течение 2 ч ФСБ, блокировали 5% нормальной ослиной сывороткой в 1% ФСБ-Тритон и окрашивали при разведении 1:20 мышинным антителом против SSEA1¹³ или при разведении 1:500 кроличьим антителом против ЗФБ (Abcam) в блокирующем буфере в течение ночи. После промывки в течение 2 ч 1% ФСБ-Тритон добавляли вторичное ослиное антитело к мышинному cy3 1:500 (Jackson Immunoresearch laboratories) или вторичное антикроличье анти-alexa488 1:500 (Molecular Probes) в течение 3 часов в блокирующем буфере. Ткань контрокрашивали ДАФИ (Sigma) и заключали в глицерине, и визуализировали с помощью конфокального микроскопа (Leica, TCS SPE, Wetzlar, Germany).

Таблица 3 - Список праймеров

Праймер	Последовательность
P1	TTTTGAATGAAGGGCCTGAG SEQ ID NO: 4
P2	TGAACCAATCAGAGTGGGAC SEQ ID NO: 5
P3	GTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCGCCGTTTCCACATTCTTTTCTC SEQ ID NO: 6
P4	GGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGTGAACCAATCAGAGTGGGACATGAC SEQ ID NO: 7
P5	GTCATGTCCCACTCTGATTGGTTCACACATTTCCTCCGAAAAGTGCCACC SEQ ID NO: 8
P6	GAGAAAAGAATGTGGAAACGGCGATCTCCATAAGAGAAGAGGGAC SEQ ID NO: 9
P7	GAAGTGTGCTGCTAACCTG SEQ ID NO: 10
P8	GCTATGAACTAATGACCCCG SEQ ID NO: 11
P9	TTTTCCTCCTCTCCTGACTAC SEQ ID NO: 12
P10	GGCCTGGATGATAAGAGTCTTC SEQ ID NO: 13
P11	GCTATTCGGCTATGACTGGG SEQ ID NO: 14
P12	GAAGGCGATAGAAGGCGATG SEQ ID NO: 15
P13	GTGGAACACAGCTTTTCCAG SEQ ID NO: 16
P14	GCTCTTCAACTTGCCATTG SEQ ID NO: 17
P15	TCAACAGCACGTAAGCAAC SEQ ID NO: 18
P16	CCTGACTCCATTTTGTAGCC SEQ ID NO: 19
P17	CCCAATATAACACGCTTCACT SEQ ID NO: 20
P18	GAAATGAATTATTTTCTGGCGAC SEQ ID NO: 21
P19	AGCTCTTTCTCGATTCCGTG SEQ ID NO: 22
P20	GGGTAGACACAAGCTGAGCC SEQ ID NO: 23
P21	CAACTATCAGGCTCCACCAC SEQ ID NO: 24
P22	CTCAGACGGTTTTTCAGGGTT SEQ ID NO: 25
P23	AGGCTATGGGATGATGCAAG SEQ ID NO: 26
P24	GTAGGTAGGCGATCCGTTCA SEQ ID NO: 27
P25	CGAGACCAACGTGAAGGGAA SEQ ID NO: 28
P26	CAGACCCGGACAACGTCTTT SEQ ID NO: 29
P27	CTCTGGGGCTCACCTACAAG SEQ ID NO: 30
P28	AGCCCTGGTGAAATGTAGGG SEQ ID NO: 31
P29	AGCTCTCATCTCAAGGCACA SEQ ID NO: 32
P30	GGAAAGATCCACTGCTTCCA SEQ ID NO: 33
P31	AGCACAGGTGGTGAACGAACCA SEQ ID NO: 34
P32	TCCAGGCCTCTTGATGCTACCGA SEQ ID NO: 35
P34	CACCGCCAAATAAGGCACGTTATC SEQ ID NO: 36
P35	AAACGATAACGTGCCTTATTTGGC SEQ ID NO: 37
P36	CACCGACCAGATAACGTGCCTTATT SEQ ID NO: 38
P37	AAACAATAAGGCACGTTATCTGGT SEQ ID NO: 39
P38	TTGCAGTGGTTACCGTTCG SEQ ID NO: 40
P39	TAGTAGGCATCTTGTGGGGG SEQ ID NO: 41
P40	ATGAATGGAGCTATAGGAGG SEQ ID NO: 42
P41	CCACGTCTCCTGCTTGCTTTAACAGAGAGAAGTTCGTGGCATCGCCATCTTCCAGCAGGCG SEQ ID NO: 43
P42	TGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCTATGAAGATGG ACAAAAAGAC SEQ ID NO: 44

P43	TTACAGCCCGGACCGACGATG SEQ ID NO: 45
P44	ATCTGACCCGGGATGAATGGAGCTATAGGAGG SEQ ID NO: 46
P45	GTAGCTGCTAGCTTACAGCCCGGACCGACGATG SEQ ID NO: 47
P46	CAGGTCCCCGGGATGGATCCTGATGATGTTG SEQ ID NO: 48
P47	GCATGTGCTAGCTTAGAGCTTTAAATCTCTG SEQ ID NO: 49

Последовательности плазмид

1. pX330-GFP (SEQ ID NO: 50)
2. CRISPR1 (SEQ ID NO: 51)
3. CRISPR3 (SEQ ID NO: 52)
4. pJet-Has (SEQ ID NO: 53)
5. pCAGG-Neo-IRES-GFP (SEQ ID NO: 54)
6. Нацеливающий вектор (SEQ ID NO: 55)
7. pmCherry-Cry2-CreN (SEQ ID NO: 56)
8. pmCherry-CIBN-CreC (SEQ ID NO: 57)
9. pB-RAGE-GFP (SEQ ID NO: 58)
10. pCAGG-IRES-GFP (SEQ ID NO: 59)
11. pCAGG-Optogenes (SEQ ID NO: 60)
12. pB-RAGE-mCherry (SEQ ID NO: 61)
13. pSK BS-PGK-DTA (SEQ ID NO: 62)
14. pGK-IRES-GFP (SEQ ID NO: 63)
15. pGK-DTA-IRES-GFP (SEQ ID NO: 64)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и изучение характеристик линий ПЗК

На самых ранних стадиях эмбрионального развития, вскоре после яйцекладки и до начала гаструляции, ПЗК рострально мигрируют в область герминального полулуния в передней части внеэмбрионального слоя мезодермы. Считается, что эта миграция «защищает» ПЗК от процессов дифференцировки, как это происходит в случае соматических клеток. Только после формирования area opaca vasculosa, крови и сердцебиения, приблизительно через 2,5 суток инкубации (стадия 14-17 H&N¹), клетки возвращаются к эмбриону через кровоток и колонизируют генитальный гребень, из которого разовьются гонады. На этих этапах, используя микропипетку с отверстием диаметром ~ 40–60 пм, из сосудистой системы эмбрионов брали 1–3 пл крови и переносили в лунку в 48-луночном планшете, содержащую культуральную среду для ПЗК. Культуральная среда ПЗК обеспечивает возможность быстрого деления ПЗК (20–24 часа

клеточного цикла) с сохранением при этом недифференцированного состояния в условиях отсутствия фидера. Через 2–3 недели в культуре клетки крови разлагались и исчезали². В течение еще 1–2 недель культивируемые ПЗК стали конфлюэнтными (Фиг. 5А). Эти клетки можно дополнительно выращивать для генной модификации или их можно с успехом заморозить и разморозить для модифицирования позже. Куриные ПЗК в культуре были широко охарактеризованы в литературе с помощью морфологических признаков, профилей экспрессии белка и мРНК и, наконец, по их способности в отношении миграции гонад при обратной инъекции в сосудистую сеть эмбриона-реципиента на такой же стадии развития³⁻⁵. Эти характеристики были исследованы в полученных клеточных культурах ПЗК, чтобы показать, что они сохраняют хорошо известные свойства ПЗК. Морфологически ПЗК представляют собой большие, немного гранулированные клетки диаметром около 15–20 пм, содержащие крупные ядра. ПЗК являются тотипотентными клетками, поэтому они экспрессируют плюрипотентные маркеры, такие как cPouV, SOX2, KLF4 и Nanog, и два уникальных маркера зародышевых клеток – cVH и DAZL. Для каждой линии ПЗК экстрагировали ДНК для определения пола, используя праймеры для рибосомального S18 (P19-P20, размер продукта 256 п. о.) в качестве положительного контроля и праймеры для W-хромосомы (P17-P18, размер продукта 415 п. о.) для идентификации самок (Фиг. 5В)⁶. Кроме того, ПЗК экспрессируют мембранный антиген SSEA-1⁴ (Фиг. 5С).

10 линий ПЗК были установлены из клеток несушек и бройлеров, как мужских, так и женских линий. Трансфекцию плазмид осуществляли, используя катионно-липидный реагент для трансфекции липофектамин 2000, который взаимодействует с отрицательно заряженной ДНК, обеспечивая ее проникновение в клетку. Трансфекция плазмидой, кодирующей ЗФБ (pCAGG-GFP⁷), приводила к эффективности трансфекции около 15–20% (Фиг. 5D). Кроме того, эффективность трансфекции ПЗК при применении электропорации привела к повышению эффективности до 90% (Фиг. 5Е). Чтобы продемонстрировать, что культивируемые ПЗК успешно колонизируют гонады, экспрессирующие ЗФБ, ПЗК вводили в кровоток на стадии 14–16 Н&Н и инкубировали эмбрионы в течение 10 суток. Проводили иссечение эмбрионов и идентификацию ЗФБ-положительных клеток в гонадах (Фиг. 5F).

Конструирование мишеней CRISPR-Cas9 в Z-хромосоме

Редактирование ДНК в Z-хромосоме осуществляли, используя CRISPR-Cas9 и процессы гомологичной рекомбинации. Тогда как система CRISPR-Cas9 непосредственно разрезает ДНК в определенном сайте Z-хромосомы, эндогенная система репарации,

использующая процесс гомологичной рекомбинации, позволяет осуществить целевую вставку необходимой ДНК в точной локации. Для этой цели необходимо сконструировать плазмиду нацеливающего вектора, которая содержит плечи гомологии, соответствующие сайту вставки в Z-хромосоме. Был выбран сайт для вставки ДНК в Z-хромосому ниже кодирующего гена HINTZ. Во многих исследованиях было показано, что применение системы CRISPR улучшает прямую вставку ДНК. Широко используемая для этой цели плазида рх330 содержит сайт онРНК и фермент Cas9⁸. Сайт онРНК содержит уникальную последовательность, которая направляет фермент Cas9 на целевой сайт и приводит к созданию нацеленного на конкретную область генома ДЦРД (двухцепочечного разрыва ДНК). Используя инструмент для конструирования CRISPR, идентифицировали уникальную последовательность для онРНК, как проиллюстрировано на Фиг. 6А. Первые 12 направляющих в соответствии с их оценкой приведены на Фиг. 6В и в Таблице 1.

Двадцать нуклеотидных последовательностей, направляющие №1 и №3, выбирали по традиционному сходству вторичной структуры и путем проверки возможных нецелевых сайтов в курином геноме, которым были присвоены оценки по степени несоответствия. Первые 10 результатов поиска потенциальных нецелевых сайтов для направляющей №1 приведены на Фиг. 6С и в Таблице 2. Следует отметить, что первые 6 нецелевых сайтов имеют по 4 несоответствия, что подчеркивает специфичность этой направляющей.

Вставку последовательности ДНК осуществляли путем разрезания модифицированной плазмиды рх330, которая содержит ЗФБ в рамке считывания, слитый с С-концом Cas-9. Отожженные праймеры, содержащие последовательности онРНК, лигировали к рестрикционному ферменту BbsI, как было описано ранее. (Фиг 6В). Продукты лигирования трансформировали в E.coli, плазмиды очищали и подтверждали вставку онРНК сиквенированием.

Проверка активности системы CRISPR-Cas9

Посредством выращивания ПЗК в культуральной среде без фидера были получены чистые колонии, происходящие из одиночных клеток, что позволило изучить характеристики эффективности системы CRISPR-Cas9. Для этого ПЗК трансфицировали плазмидами рХ330-GFP-CRISPR1 и рХ330-GFP CRISPR3 и выращивали клональные колонии. Общую геномную ДНК экстрагировали из колоний, происходящих из одиночных клеток, экспрессирующих ЗФБ. ДНК анализировали с помощью эндонуклеазного анализа и сиквенировали. Для эндонуклеазного анализа был

сконструирован положительный контроль. Этот контроль представлял собой 320 п. о. продукт ПЦР с введенными мутациями в предсказанном сайте активности CRISPR-Cas9. Этот продукт смешивали с продуктом ДТ аналогичной длины в различных соотношениях, 1:15, 1:7, 1:1 мутированный продукт:ДТ, соответственно, а отожденную смесь подвергали эндонуклеазной активности (Фиг. 7А). Две короткие полосы с прогнозируемым размером 136 п. о. и 184 п. о. были отчетливо видны при соотношениях 1:7 и 1:1, что указывает на то, что анализ работал правильно. Аналогично, такой же анализ проводили для геномной ДНК, полученной из 12 колоний, трансфицированных плазмидами CRISPR1 и CRISPR3 (Фиг. 7В, С). В 9 из 12 колоний наблюдали четкий дублет с предсказанным размером. Это указывает на то, что плазмиды CRISPR1 и CRISPR3 эффективно генерируют ДЦРД в предсказанном сайте.

Для анализа сиквенирования продукты ПЦР, которые использовали для эндонуклеазного анализа (Фиг. 7А–С), также сиквенировали (Фиг. 8А–D). Сиквенирование отрицательного контроля ДТ выявило предсказанный сайт расщепления CRISPR1 (Фиг. 8А). Сиквенирование смеси ДТ и искусственно мутированного продукта в качестве положительного контроля выявило появление двойных пиков на хроматограмме ДНК непосредственно после предсказанного сайта расщепления (синяя стрелка, Фиг. 8В). Аналогичное сиквенирование такой же геномной области в трансфицированных колониях выявило как отрицательные (Фиг. 8С), так и положительные (синяя стрелка, Фиг. 8D) колонии, причем последние были в > 70% случаев.

Конструирование нацеливающего вектора для интеграции в геном

Чтобы продемонстрировать нацеленную геномную интеграцию в Z-хромосому посредством ГР, конструировали нацеливающий вектор (Фиг. 9А–F). Вектор содержит промотор рCAGG, за которым следует ген селекции неомицина, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), 3ФБ и сайт полиаденилирования кроличьего бета-глобина. Эта кассета фланкировалась ~ 1,5 т. п. о. плечами гомологии в 5' и 3' концах соответственно. Для создания этого вектора фрагмент ДНК размером ~ 3 т. п. о., содержащий оба плеча гомологии, амплифицировали, используя праймеры Р1 и Р2, и лигировали в челночный вектор pjet1.2. Обнаружили, что полное сиквенирование этого фрагмента идентично последовательности куриного генома. Эту плазмиду pJet-HAs использовали в качестве матрицы для создания линейаризованного продукта ПЦР, содержащего два разделенных плеча гомологии, за исключением 23 п. о. последовательности между ними, которая содержит сайты онРНК CRISPR. Амплификацию проводили, используя праймеры Р3 и Р4, которые содержат в 5'-конце последовательности, которые соответствуют краям кассеты

pCAGG-Neo-IRES-GFP. Этот линейный продукт ПЦР называется «вектором». Плазмиду pCAGG-Neo-IRES-GFP использовали в качестве матрицы для создания линейного продукта ПЦР. Этот фрагмент амплифицировали, используя праймеры P5 и P6, содержащие последовательности, которые соответствуют 5' и 3' концам 5'ПГ и 3'ПГ концов соответственно. Этот продукт называется «вставкой». Вектор и вставку стыковали вместе, используя реакцию сборки Гибсона¹⁰, для создания конечного нацеливающего вектора.

Гомологичная рекомбинация с Z-хромосомой с применением нацеливающего вектора и плазмиды CRISPR.

Возможность получать чистые колонии ПЗК из одной клетки позволяет идентифицировать положительные колонии, которые подверглись правильной ГР со вставкой, используя такие способы, как ПЦР и Саузерн-блот. Для трансфекции ПЗК использовали липофекцию с эффективностью трансфекции 5–10% (Фиг. 10А) или электропорацию с эффективностью > 40%. Проводили трансфекцию двумя плазмидами, нацеливающим вектором и одной из двух плазмид CRISPR, описанных выше (CRISPR1 или CRISPR3). После трансфекции клетки оставляли для восстановления на 24 часа и переносили в среду, содержащую G-418, для отбора. После двух недель отбора выжили только устойчивые к G-418 клетки, из них > 99% были ЗФБ-положительными (Фиг. 10В). Чтобы убедиться, что клетки сохраняют способность колонизировать гонады, их вводили в эмбрионы-хозяев, как описано выше на Фиг. 1F (Фиг. 8С). Проводили иммуноокрашивание гонад антителом против ЗФБ, и подтверждали колонизацию ЗФБ-положительных клеток ПЗК в гонадах, используя конфокальный микроскоп (Фиг. 10D).

Устойчивые к G-418 ЗФБ-положительные клетки состоят из потенциально гетерогенной популяции. Таким образом, чтобы верифицировать ГР-интеграцию и получить чистую гомогенную популяцию, отдельные ЗФБ-положительные клетки разделяли, используя сортировку методом FACS, в 96-луночный планшет (Фиг. 11А). Выращивали чистые колонии и экстрагировали геномную ДНК для ПЦР и Саузерн-блот анализа. Параллельно проводили сортировку объединенных ЗФБ-положительных клеток методом FACS. Для анализа ПЦР сконструировали два набора праймеров. Первый содержал прямой праймер P7 выше 5'ПГ и обратный P8 из промотора CAGG (размер продукта 1,6 т. п. о.), а второй содержал прямой праймер P9 из сайта полиаденилирования кроличьего бета-глобина и обратный P10 ниже 3'ПГ (длина продукта 1,8 т. п. о., Фиг. 11В). Как в объединенных клетках (Фиг. 11С), так и в чистых колониях (Фиг. 11D), были обнаружены ожидаемые продукты для 5' и 3', что указывает на то, что в этих клетках

имела место правильная ГР-интеграция.

Для дополнительной верификации правильной ГР-интеграции, а также подтверждения того, что в геном была интегрирована только одна копия нацеливающего вектора, проводили Саузерн-блот анализ. Анализировали две клеточные линии ПЗК от доноров мужского и женского пола. Следует отметить, что женская линия имеет только одну копию Z-хромосомы. Сконструировали три ДНК-зонда с dig-метками (желтые прямоугольники на Фиг. 12А и Фиг. 12В). Первые два зонда, амплифицированные с помощью праймеров P11-P12 и P13-P14, длиной 500 п. о. каждый, расположены выше и ниже 5' и 3' ПГ соответственно. Третий зонд, амплифицированный с помощью праймеров P15-P16 длиной 704 п. о., предназначен для обнаружения гена Neo внутри нацеливающего вектора, таким образом, он позволяет подтвердить, что была интегрирована только одна копия вектора. Для расщепления геномной ДНК для анализа использовали рестрикционный фермент BglII. Два сайта рестрикции, расположенные на расстоянии ~ 6,5 т. п. о. друг от друга, расположены в хромосоме ДТ, выше и ниже 5' и 3' зондов соответственно. Дополнительный сайт BglII расположен в нацеливающем векторе, что приводит к получению предсказанных фрагментов размером 7,5 т. п. о. и 3,3 т. п. о. для идентификации правильной ГР-интеграции. Результаты Саузерн-блот анализа геномной ДНК, выделенной из линии мужских ПЗК, выявили 2 полосы с предсказанным размером, составляющим 6,5 т. п. о. для аллели ДТ и 7,5 т. п. о. и 3,3 т. п. о. для аллели, которая подверглась правильной ГР-интеграции в отношении 5' и 3' сайтов соответственно. Это было подтверждено как для ДНК из объединенных клеток, так и для чистых колоний (Фиг. 12С). Аналогичный анализ проводили для клеточной линии женских ПЗК. В этом случае была обнаружена одна полоса с предсказанным размером 7,5 т. п. о. для 5' сайта интеграции. Поскольку женский геном содержит только одну копию Z-хромосомы, аллель ДТ (6,5 т. п. о.) обнаружена не была. Зондирование гена Neo выявило одну полосу размером 7,5 т. п. о., подтверждая, что в геном была интегрирована только одна копия нацеливающего вектора (Фиг. 12D).

Проверка оптогенетической системы в клетках HEK293 in vitro и в куриных эмбрионах in ovo.

Чтобы проверить активность индуцибельной системы *in vitro* и в куриных эмбрионах *in ovo*, три плазмиды, pmCherry-Cry2-CreN, pmCherry-CIBN-CreC и репортер PB-RAGE-GFP, трансфицировали в клетки HEK293 (Фиг. 13) и в куриные эмбрионы (Фиг. 14). Первые две оптогенные плазмиды кодируют репортерный ген mCherry, который подтверждает успешную трансфекцию. Эпресссионный вектор PB-RAGE-GFP содержит

последовательность из некоторого количества стоп-кодона, фланкируемую сайтами LoxP перед кодирующей областью ЗФБ. После активации Cre стоп-кодона удаляются, что обеспечивает возможность экспрессии ЗФБ. В отрицательных контрольных клетках НЕК293, которые трижды трансфицировали и держали в темноте, не было ЗФБ-положительных клеток (Фиг. 13, верхний ряд). В клетках, освещаемых синим светом, через 24 часа после трансфекции многие клетки экспрессировали ЗФБ (Фиг. 13, нижний ряд), подтверждая активацию оптогенетической системы в этих клетках.

Для проверки активности оптогенетической системы *in ovo* проводили тройную трансфекцию плазмидами pmCherry-Cry2-CreN, pmCherry-CIBN-CreC и PB-RAGE-GFP путем электропорации в нервные трубки куриного эмбриона на стадии 16 H&N. Через двенадцать часов после электропорации эмбрионы экспериментальной группы в течение 15 секунд освещали синим светом, тогда как эмбрионы отрицательного контроля держали в темноте. Эмбрионы инкубировали еще в течение 12 часов и проверяли в отношении экспрессии ЗФБ под флуоресцентным стереоскопом (Фиг. 14). Тогда как в эмбрионах, которые держали в темноте (Фиг. 14, верхний ряд), экспрессировался только mCherry, подтверждая успешную электропорацию, в эмбрионах экспериментальной группы были отчетливо видны ЗФБ-положительные клетки (Фиг. 9, нижний ряд), подтверждая, что был активирован индуцируемый светом Cre.

Оптогенные плазмиды pmCherry-Cry2-CreN и pmCherry-CIBN-CreC управляют экспрессией генов, используя промотор CMV¹¹, который является нежелательным в куриных клетках. Чтобы преодолеть это и объединить два в один вектор, авторы данного изобретения сконструировали плазмидный вектор, который управляет экспрессией CIBN-CreC и Cry2-CreN, связанных с помощью саморасщепляющегося пептида P2A, за которым следует IREG-GFP под управлением промотора CAGG, который высоко активен в куриных клетках. Синтез pCAGG-CIBN-CreC-P2A-Cry2-CreN-IRES-GFP был основан на модификации исходных плазмид оптогенов, описанных в Kennedy et al¹¹. Каждая из этих плазмид кодирует mCherry, за которым следует последовательность IRES с CIBN-CreC (усеченная форма CIB1, слитая с С-концом фермента Cre) или CRY2-CreN (криптохром 2, слитый с N-концом фермента Cre, Фиг. 15А). Целью следующего клонирования было объединение двух слитых оптогенов с саморасщепляющимся пептидом P2A под управлением промотора CAGG, за которым следует IRES-GFP. Для этого плазмиду CIBN-CreC использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами P40 и P41, а плазмиду CRY2-CreN использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами P42 и P43 (Фиг. 15А). В частности, праймеры P41 и P42, которые содержат сайт расщепления P2A, имеют

общую перекрывающуюся последовательность, которая обеспечивает возможность объединения двух продуктов с помощью одного цикла ПЦР с удлинением выступа (Фиг. 15B). Этот продукт, который содержит CIBN-CreC-P2A-CRY2-CreN, лигировали в челночный вектор pJet1.2 с проверенной последовательностью (Фиг. 15C). Эта плаزمида служила матрицей для ПЦР с праймерами P44 и P45, которые добавляли к продукту сайт рестрикции SmaI и NheI в 5' и 3' концах соответственно (Фиг. 15D). Этот продукт расщепляли рестрикционными ферментами и лигировали в плазмиду pCAGG-IRES-GFP, которую также разрезали, используя те же ферменты (Фиг. 15E). Для этого продукта лигирования, содержащего промотор CAGG, за которым следует CIBN-CreC, саморасщепляющийся пептид P2A, Cry2-CreN, IRES, ЗФБ и сайт полиаденилирования кроличьего бета-глобина (называемого в данном документе pCAGG-Optogenes), проводили проверку последовательности (Фиг. 15F).

Для проверки активности вектора pCAGG-Optogene *in vitro* плазмиду, которая экспрессирует ЗФБ в качестве репортера успешной трансфекции, трансфицировали в клетки HEK293 совместно с pB-RAGE-mCherry. Подобно вектору PB-RAGE-GFP, описанному выше (Фиг. 13), pB-RAGE-mCherry содержит последовательность некоторого количества стоп-кодонов, фланкируемую сайтами LoxP выше кодирующей области mCherry. После активации Cre стоп-кодоны удаляются, что обеспечивает возможность экспрессии mCherry (Фиг. 16). Тогда как среди клеток HEK293, которые котрансфицировали и держали в темноте, не было mCherry-положительных клеток (Фиг. 16, верхний ряд), среди клеток, которые освещали синим светом, многие клетки экспрессировали mCherry (Фиг. 16, нижний ряд), подтверждая, что одновекторная стратегия pCAGG-Optogenes сохраняет оптогенные свойства системы.

Чтобы проверить активность вектора pCAGG-Optogenes в живых куриных эмбрионах *in ovo*, плазмиду котрансфицировали с помощью электропорации в куриные эмбрионы на стадии 14-16 H&N вместе с pB-RAGE-mCherry. Через 12 часов после электропорации яйца группы отрицательного контроля держали в темноте, тогда как эмбрионы экспериментальной группы подвергали воздействию синего света в течение 15 секунд (Фиг. 17). Обе группы дополнительно инкубировали в течение 12 ч и исследовали под флуоресцентным стереоскопом. После инкубации обе группы выявили высокий уровень экспрессии ЗФБ, что свидетельствует об успешной электропорации. Тем не менее, только в подвергнутой воздействию света группе (Фиг. 17, нижний ряд) были идентифицированы mCherry-положительные экспрессирующие клетки, что указывает на то, что оптогенная система с применением одновекторной стратегии pCAGG-Optogenes

была активирована светоиндуцируемым образом.

Индукция летальности куриных эмбрионов

Чтобы продемонстрировать возможность обеспечения смертности с помощью токсина, кодирующую область DTA¹², обычно используемого в качестве отрицательного селективного маркера, клонировали в экспрессионный вектор, содержащий промотор pGK, за которым следует IRES GFP (pGK-IRES-GFP). Эта плазмида также служила отрицательным контролем. Область, кодирующую DTA, клонировали выше последовательности IRES с образованием pGK-DTA-IRES-GFP, который после экспрессии в клетках ингибирует синтез белка, что приводит к гибели клеток.

Для исследования эффектов экспрессии DTA в куриных эмбрионах, эмбрионы на стадии 14-16 Н&Н подвергали электропорации вектором pGK-IRES-GFP в качестве отрицательного контроля или вектором pGK-DTA-IRES-GFP. Через двенадцать часов после электропорации эмбрионы анализировали в отношении экспрессии ЗФБ под флуоресцентным микроскопом (Фиг. 18). Тогда как в контрольных эмбрионах ЗФБ широко экспрессировался в нервной трубке (Фиг. 18), в эмбрионах, экспрессирующих DTA, экспрессия ЗФБ обнаружена не была, указывая на то, что синтез белка в этих клетках блокировался.

Хотя изобретение было описано в сочетании с конкретными вариантами его осуществления, очевидно, для специалистов в данной области техники очевидно существование многих альтернативных вариантов, модификаций и вариаций. Соответственно, подразумевается, что оно охватывает все такие альтернативные варианты, модификации и вариации, которые соответствуют сущности и объему прилагаемой формулы изобретения.

10 Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, полностью включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждые отдельные публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны как включенные в данный документ посредством ссылок. Кроме того, цитирование или идентификацию любой ссылки в этой заявке не следует рассматривать как признание того, что такая ссылка доступна в качестве уровня техники, предшествующего данному изобретению. В той степени, в которой используются заголовки разделов, их не следует рассматривать как обязательные ограничения.

ЛИТЕРАТУРА

1. HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49-92 (1951).
2. Nandi, S. *et al.* Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. *Poult. Sci.* **95**, 1905-1911 (2016).
3. van de Lavoie, M.-C. *et al.* Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* **441**, 766-9 (2006).
4. Karageng, L., Cinnamon, Y., Ginsburg, M. & Petite, J. N. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet.* **19**, 290-301 (1996).
5. Naito, M., Harumi, T. & Kuwana, T. Long-term culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and production of germline chimaeric chickens. *Anim. Reprod. Sci.* **153**, 50-61 (2014).
6. Clinton, M., Haines, L., Belloir, B. & McBride, D. Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. *Br. Poult. Sci.* **42**, 134-8 (2001).
7. Cinnamon, Y., Ben-Yair, R. & Kalcheim, C. Differential effects of N-cadherin-mediated adhesion on the development of myotomal waves. *Development* **133**, 1101-12 (2006).
8. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-23 (2013).
9. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281-2308 (2013).
10. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343-345 (2009).
11. Kennedy, M. J. *et al.* Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **7**, 973-975 (2010).
12. Lu, Q. R. *et al.* Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**, 75-86 (2002).
13. Solter, D. & Knowles, B. B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 5565-9 (1978).
14. Mashiko, D. *et al.* Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev. Growth Differ.* **56**, 122-9 (2014).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент для редактирования ДНК, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты для индуцибельного обеспечения летального фенотипа у эмбрионов петушков в яйце птицы и вторую последовательность нуклеиновой кислоты для направления на Z-хромосому клетки птицы указанной первой последовательности нуклеиновой кислоты для осуществления действия указанного летального фенотипа.

2. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок летальности и функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей переключатель, который регулирует экспрессию указанного белка летальности, причем указанный переключатель регулируется индуктором.

3. Агент для редактирования ДНК по п. 2, отличающийся тем, что указанный белок летальности выбран из группы, состоящей из токсина, проапоптотического белка, ингибитора сигнального пути Wnt, антагониста BMP и антагониста FGF.

4. Агент для редактирования ДНК по п. 1, который представляет собой одиночную молекулу.

5. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты и указанная вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержатся в неидентичных молекулах.

6. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует фермент эндонуклеазы, который может осуществлять редактирование генома, и функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей переключатель, который регулирует экспрессию указанного белка эндонуклеазы, причем указанный переключатель регулируется индуктором.

7. Агент для редактирования ДНК по п. 4, отличающийся тем, что указанная вторая последовательность нуклеиновой кислоты содержит:

(i) нуклеотидную последовательность левого плеча гомологии (ЛПГ), которая по существу гомологична 5' области, фланкирующей локус целевого гена в Z-хромосоме птицы; и

(ii) нуклеотидную последовательность правого плеча гомологии (ППГ), которая по существу гомологична 3' области, фланкирующей указанный локус целевого гена в Z-хромосоме птицы.

8. Агент для редактирования ДНК по пп. 2 или 6, отличающийся тем, что указанный индуктор выбран из группы, состоящей из температуры, ультразвука, электромагнитной энергии и химического вещества.

9. Агент для редактирования ДНК по пп. 2 или 6, отличающийся тем, что указанный переключатель содержит расщепленный рекомбиназный фермент, который объединяется с образованием активного фермента в присутствии указанного индуктора.

10. Агент для редактирования ДНК по пп. 2 или 6, отличающийся тем, что указанный переключатель содержит индуцибельный промотор.

11. Агент для редактирования ДНК по п. 6, отличающийся тем, что указанный фермент эндонуклеазы представляет собой фермент РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазы.

12. Агент для редактирования ДНК по п. 11, дополнительно содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует направляющую РНК, которая нацелена на существенный ген птицы, причем указанная нуклеотидная последовательность функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей указанный переключатель.

13. Агент для редактирования ДНК по п. 12, отличающийся тем, что указанный существенный ген выбран из группы, состоящей из BMPR1A, BMP2, BMP4 и FGFR1.

14. Агент для редактирования ДНК по п. 11, отличающийся тем, что указанный фермент РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазы выбран из группы, состоящей из цинк-пальцевых нуклеаз (ZFN, англ. «zinc-finger nuclease»), эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (TALEN, англ. «transcription activator-like effector nuclease»), и

каспазы 9.

15. Агент для редактирования ДНК по любому из пп. 1–14, дополнительно содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует репортерный полипептид.

16. Агент для редактирования ДНК по пп. 2 или 6, отличающийся тем, что указанный индуктор представляет собой электромагнитную энергию.

17. Агент для редактирования ДНК по п. 16, отличающийся тем, что указанная электромагнитная энергия является составляющей видимого света.

18. Агент для редактирования ДНК по п. 17, отличающийся тем, что компонент видимого света представляет собой синий свет.

19. Агент для редактирования ДНК по любому из пп. 1–18, отличающийся тем, что указанная птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки и перепела.

20. Популяция клеток, содержащая клетки птицы, которые содержат экзогенный полинуклеотид, который стабильно интегрирован в Z-хромосому клеток, причем указанный экзогенный полинуклеотид предназначен для обеспечения летального фенотипа у потомства мужского пола указанной птицы.

21. Популяция клеток по п. 20, отличающаяся тем, что указанное обеспечение происходит индуцибельным образом.

22. Популяция клеток по п. 20, отличающаяся тем, что указанные клетки включают примордиальные зародышевые клетки (ПЗК).

23. Популяция клеток по п. 20, отличающаяся тем, что указанные клетки включают гаметы.

24. Популяция клеток по п. 20, отличающаяся тем, что указанные ПЗК выбраны из группы, состоящей из ПЗК гонад, ПЗК крови и ПЗК зародышевого полулуния.

25. Химерная птица, содержащая популяцию клеток по пп. 20 или 24.

26. Способ получения химерной птицы, включающий введение популяции клеток по п. 22 в эмбрион птицы-реципиента в условиях, достаточных для того, чтобы по меньшей мере одна из ПЗК популяции клеток колонизировала гонаду эмбриона птицы-реципиента, с получением, таким образом, химерной птицы.

27. Способ по п. 26, дополнительно включающий инкубацию химерной птицы до вылупливания после указанного введения.

28. Способ по п. 27, дополнительно включающий выращивание химерной птицы до половой зрелости, при этом указанная химерная птица вырабатывает гаметы, полученные из донорских ПЗК.

29. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанное введение осуществляется посредством инъекции *in ovo*.

30. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанная популяция клеток получена от того же вида птиц, что и птица-реципиент.

31. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанная популяция клеток получена от вида птиц, отличного от птицы-реципиента.

32. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток вводят, когда эмбрион-реципиент находится между приблизительно стадией IX в соответствии с системой стадирования Эйял-Гилади и Кохава (Eyal-Giladi & Kochav) и приблизительно стадией 30 в соответствии с системой стадирования Гамбургера и Гамильтона (Hamburger & Hamilton).

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток вводят, когда эмбрион-реципиент находится после стадии 14 в соответствии с системой стадирования Гамбургера и Гамильтона.

34. Химерная птица, полученная в соответствии со способом по любому из пп. 26–28.

35. Трансгенная птица, полученная с помощью гамет химерной птицы по п. 34.

36. Способ уменьшения числа петушков, вылупляемых из оплодотворенных яиц птицы, в котором экзогенный полинуклеотид стабильно интегрирован в Z-хромосому птицы, причем указанный экзогенный полинуклеотид предназначен для индуцибельного обеспечения летального фенотипа у потомства мужского пола указанной птицы,

при этом указанный способ включает воздействие на указанные яйца индуктора, который обеспечивает летальный фенотип, тем самым уменьшая количество петушков, вылупляемых из оплодотворенных яиц птицы.

37. Система для редактирования ДНК, содержащая:

(i) первый агент, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты для обеспечения летального фенотипа в яйце птицы, функционально связанную с сайтом распознавания рекомбиназы, и последовательность для направления указанной первой последовательности нуклеиновой кислоты на Z-хромосому клетки птицы для осуществления действия указанного летального фенотипа; и

(ii) второй агент, содержащий вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует фермент рекомбиназы, и последовательность для направления указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты на Z-хромосому клетки птицы.

38. Система для редактирования ДНК по п. 37, отличающаяся тем, что указанная первая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок летальности или фермент эндонуклеазы, который может осуществлять редактирование генома.

39. Система для редактирования ДНК по п. 37, отличающаяся тем, что указанная последовательность для направления указанной первой или указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты на X-хромосому содержит:

(i) нуклеотидную последовательность левого плеча гомологии (ЛПГ), которая по существу гомологична 5'-области, фланкирующей локус целевого гена в Z-хромосоме птицы; и

(ii) нуклеотидную последовательность правого плеча гомологии (ППГ), которая по существу гомологична 3' области, фланкирующей указанный локус целевого гена в Z-хромосоме птицы.

40. Способ уменьшения числа петушков, вылупляемых из оплодотворенных яиц птицы, включающий:

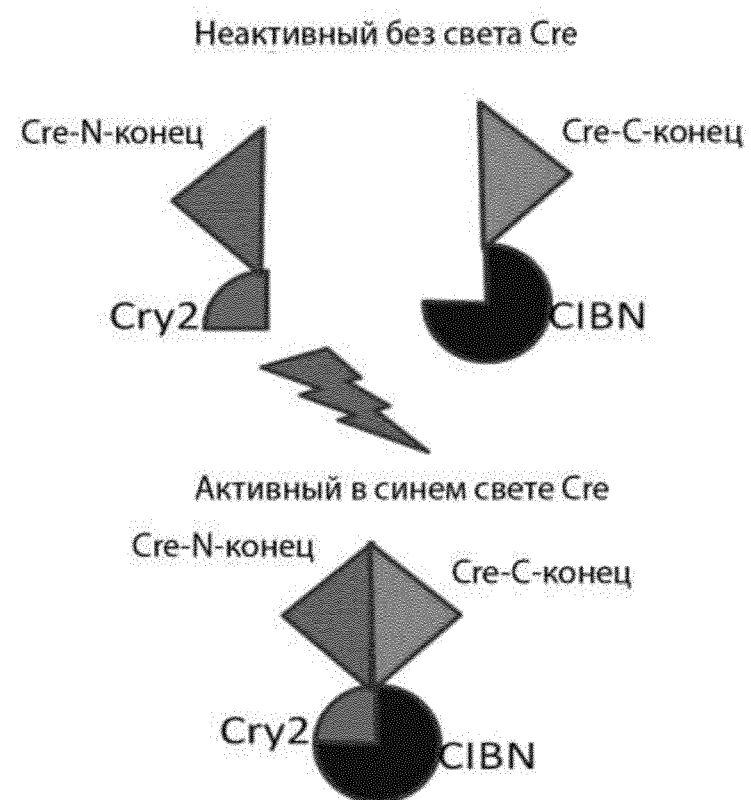
спаривание самки птицы с самцом птицы, при этом первый экзогенный полинуклеотид, который функционально связан с сайтом распознавания рекомбиназы, стабильно интегрирован в Z-хромосому указанного самца птицы, причем указанный экзогенный полинуклеотид предназначен для обеспечения летального фенотипа в яйце птицы, а второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий фермент рекомбиназы, стабильно интегрирован в Z-хромосому указанной самки птицы, или

указанный первый экзогенный полинуклеотид, который функционально связан с сайтом распознавания рекомбиназы, стабильно интегрирован в Z-хромосому указанной самки птицы, причем указанный экзогенный полинуклеотид предназначен для обеспечения летального фенотипа в яйце птицы, а второй экзогенный полинуклеотид, кодирующий фермент рекомбиназы, стабильно интегрирован в Z-хромосому указанного самца птицы,

тем самым уменьшая число петушков, вылупляемых из оплодотворенных яиц птицы.



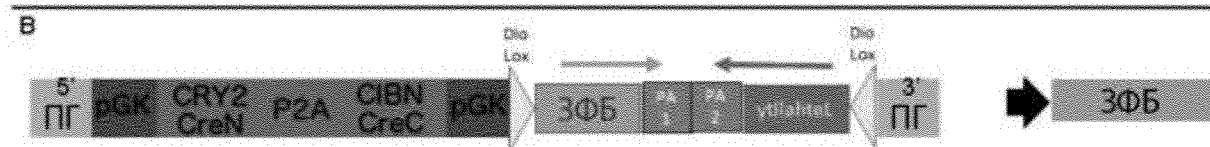
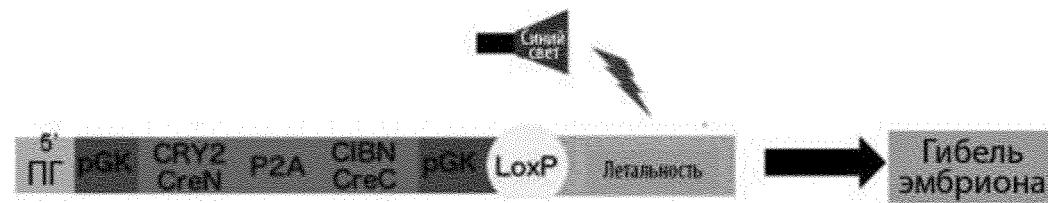
Фиг. 1



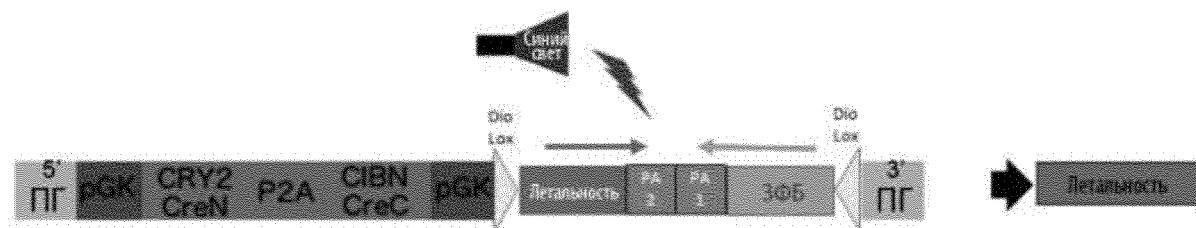
Фиг. 2

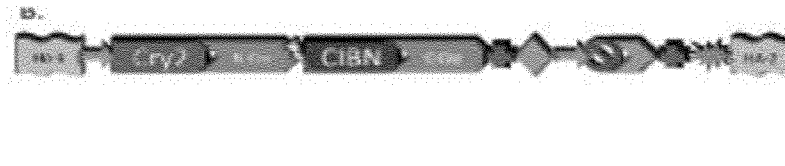


Фиг. 4А



Фиг. 4В



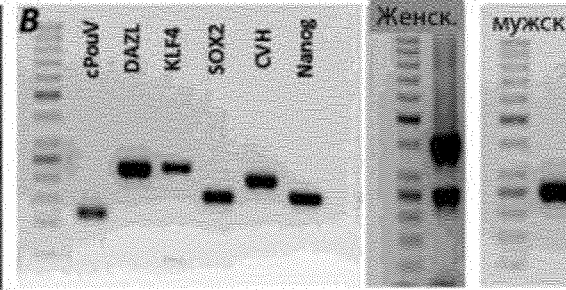
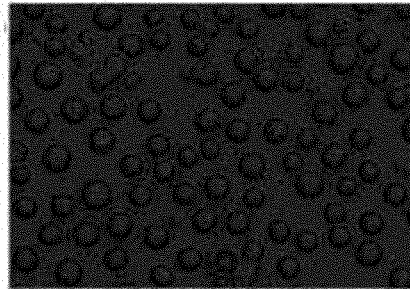


Элементы:

- PG-1 5' плечо гомологии
- PG-2 3' плечо гомологии
- Cry2 Ген Cry2
- CIBN Ген CIBN
- Cre Ген летальности
- Cre N-конец Cre
- Cre C-конец Cre
- Signal Ядерной локализации
- LoxP-Stop-LoxP Сайт LoxP-Stop-LoxP
- pGK Промотор pGK
- 2A Сайт расщепления пептида 2A
- IRES Сайт внутренней посадки рибосомы
- Reporter Ген флуоресцентного репортера
- Cas9
- gRNA онРНК

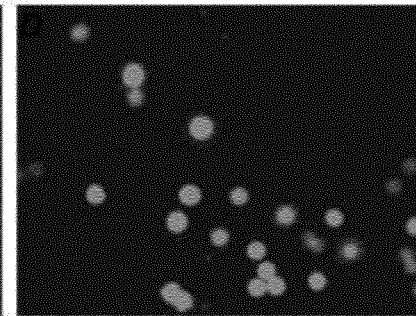
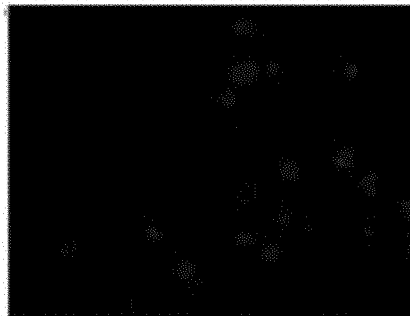
Фиг. 4С

Фиг. 5А



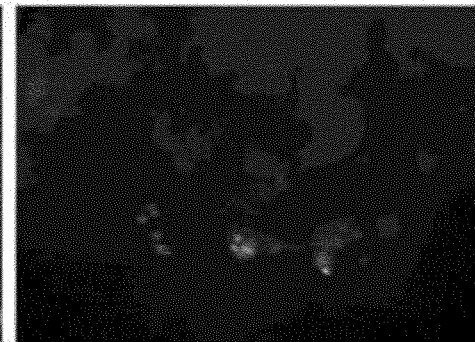
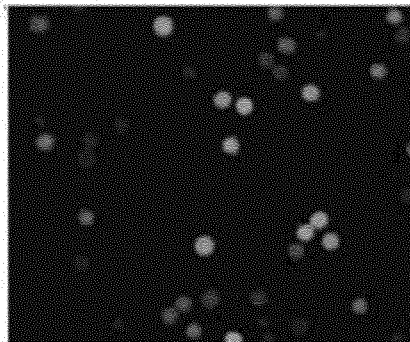
Фиг. 5В

Фиг. 5С

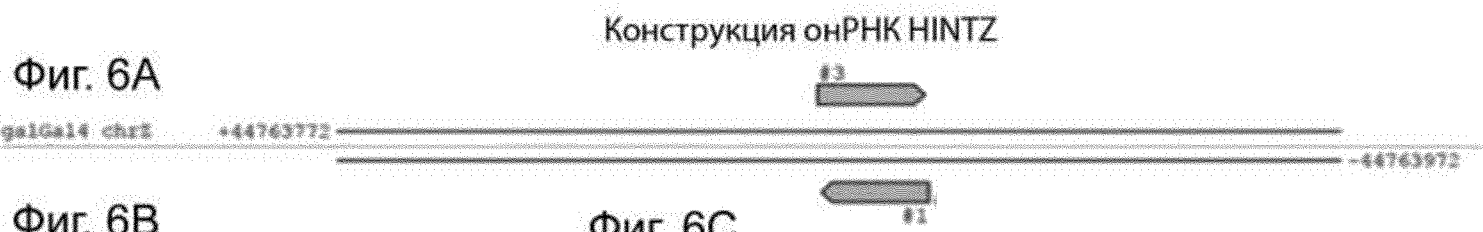


Фиг. 5D

Фиг. 5Е



Фиг. 5F



Фиг. 6В

все направляющие

оценка присвоена по обратной вероятности нецелевого связывания

[mouse over for details](#) [show legend](#)

Фиг. 6С

направляющая №1 оценка качества 92

последовательность направляющей : GCSAATAAGGCACTTATC TGG

покус на мишени : chr1:-44763848

число нецелевых сайтов: 43 (3 находятся в генах)

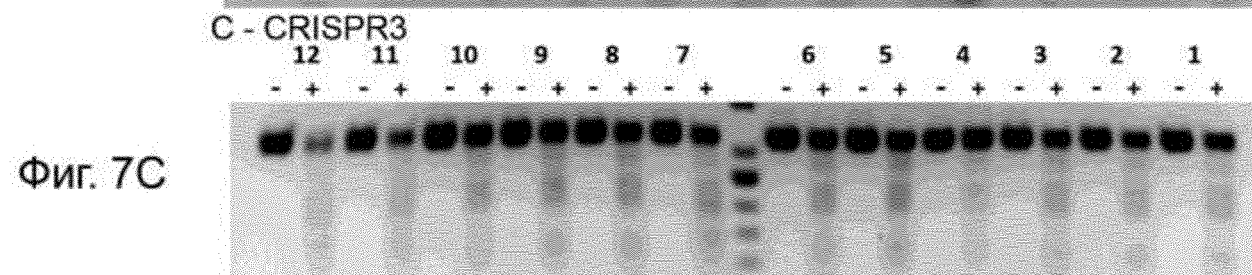
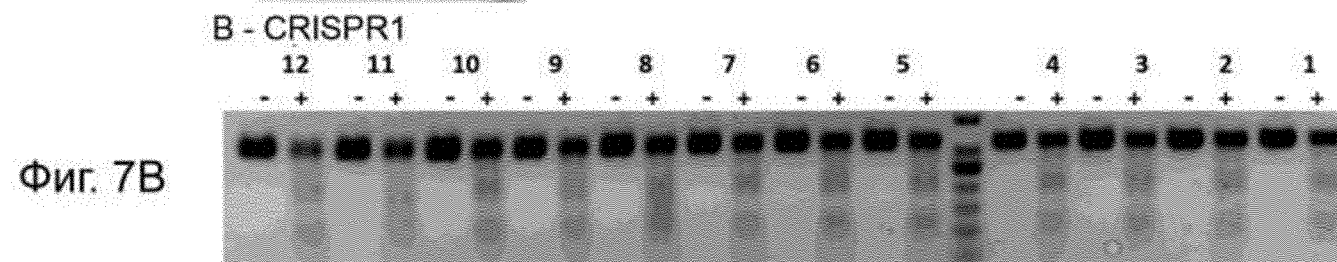
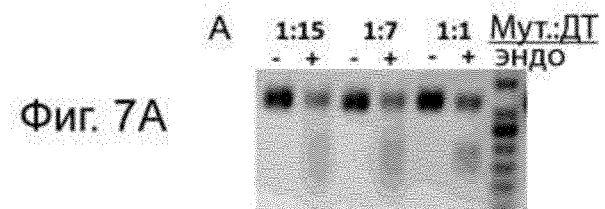
	оценка	последовательность
Направляющая №1	92	GCSAATAAGGCACTTATC TGG
Направляющая №2	87	AATGTGGAAACGACCAATA AGG
Направляющая №3	86	ACCAGATAACCTGCTTATT TGG
Направляющая №4	84	ACATGACACGACGATTTTGT AGG
Направляющая №5	84	CTGGTATGAACCAATCAGAG TGG
Направляющая №6	81	TGGTATGAACCAATCAGAGT GGG
Направляющая №7	77	GACCTTGATGCAAGAAAAC AGG
Направляющая №8	63	CTCCTGTTTTCTCTGCATCA AGG
Направляющая №9	54	GCAAGAGAAAACAGGAGACA AGG
Направляющая №10	52	AGAAGGATGAGAAAAGAATG TGG
Направляющая №11	41	CTGTCATGTCCCACTCTGAT TGG
Направляющая №12	38	ATGAGAAAAGCAATGTGGAAA CGG

первые 20 полногеномных нецелевых сайтов

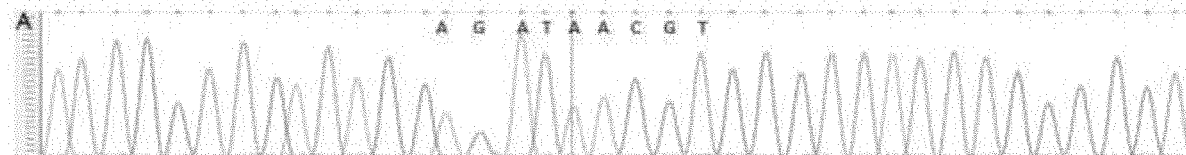
последовательность	оценка	несовпадения
CCACAGAGGCACTTATCCAG	0.9	499n [1:3:5:7]
TCAAAATAAGTACTTATCTAG	0.7	499n [1:3:10:17]
GCATATAAGCACTTATACAG	0.6	499n [2:5:10:29]
GCATAATACTTATCTGAC	0.6	499n [3:4:10:12]
ACTAAATCAAGCACTGATCTGG	0.6	499n [1:3:8:17]
GCTAAATTAGCTGTTATCGGG	0.5	499n [3:8:10:13]
GTCAAATGAGGCACTTATCAGG	0.4	399n [2:8:14]
TTCAAATAGGCACTTATTCAG	0.4	499n [1:2:11:20]
GTCAAAGAGCATTTATCAGG	0.3	399n [2:7:14]
GCTAATAAGCACTTTTCAGG	0.3	499n [1:4:10:18]

☐ показать все экзонные

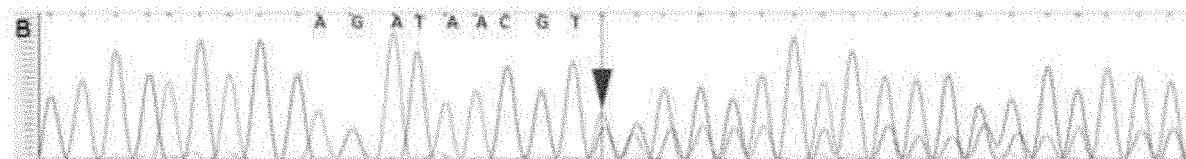
ген UCSC	локус
	chr2:+3158554
	chr3:+47694248
	chr5:+5997853
	chr5:-32615473
	chr1:-120450563
	chr9:-2097883
	chr1:+41801139
BM_001285201	chr1:-85998782
	chr1:-41801985
	chr1:-46220994



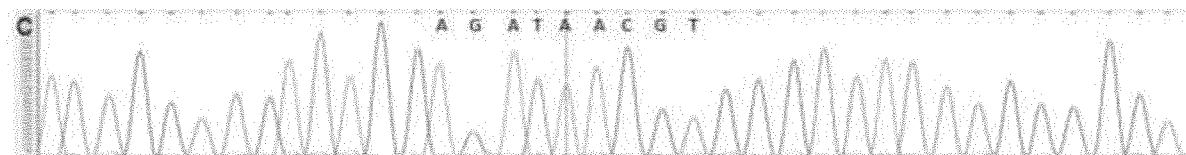
Фиг. 8А



Фиг. 8В

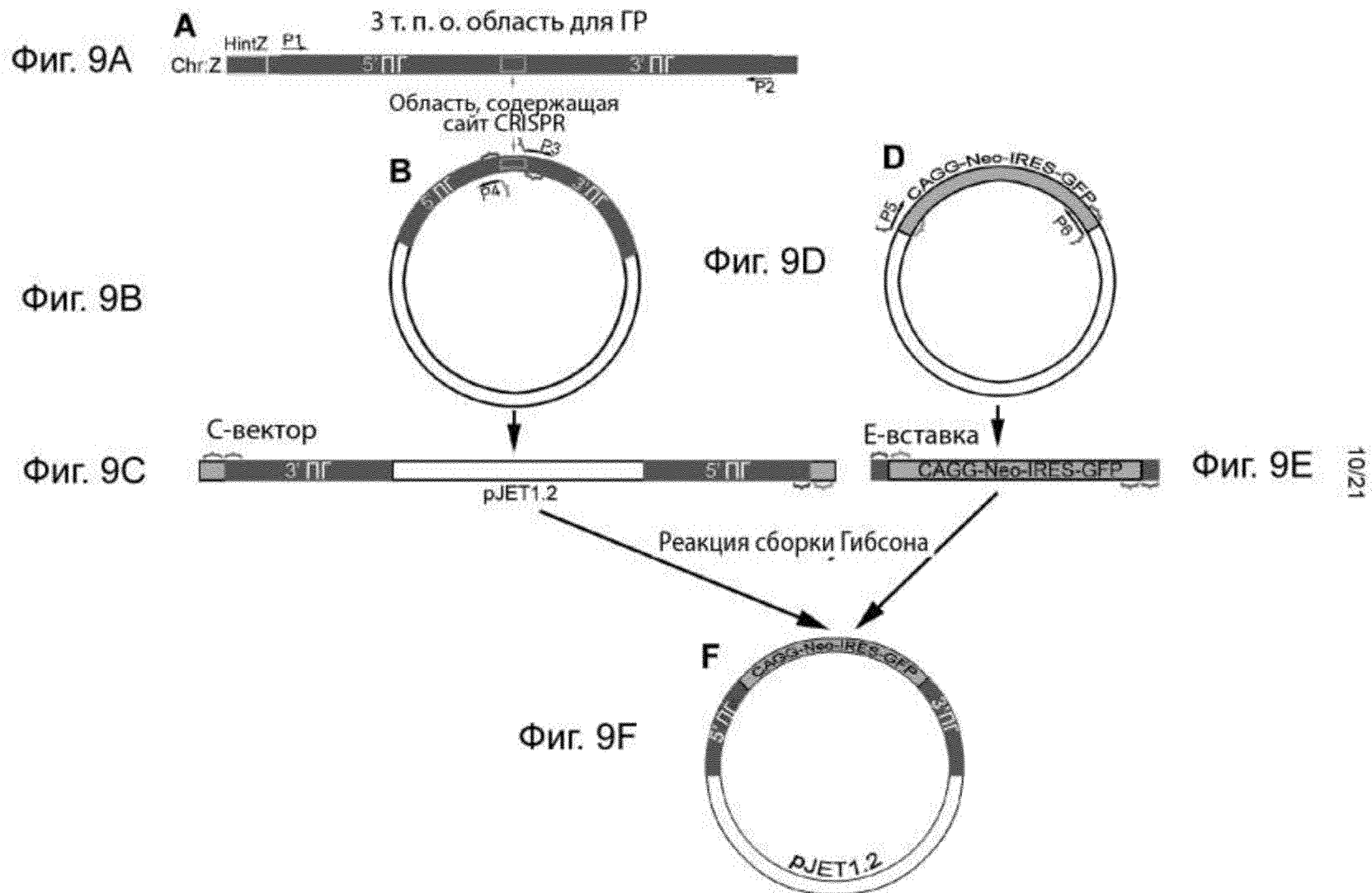


Фиг. 8С



Фиг. 8В

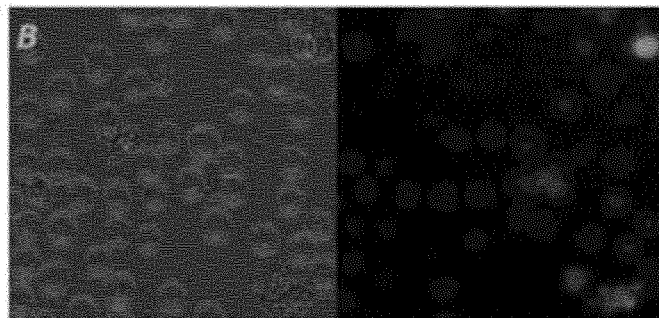




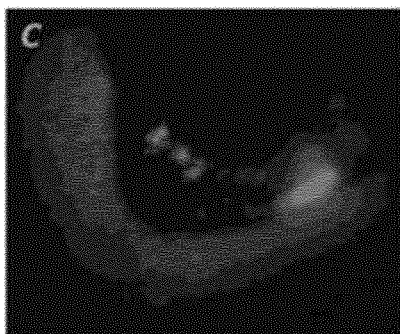
Фиг. 10А



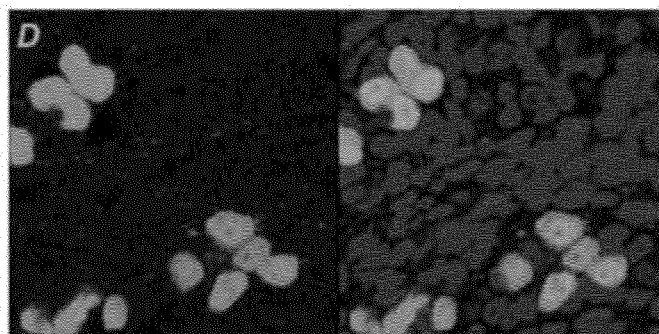
Фиг. 10В



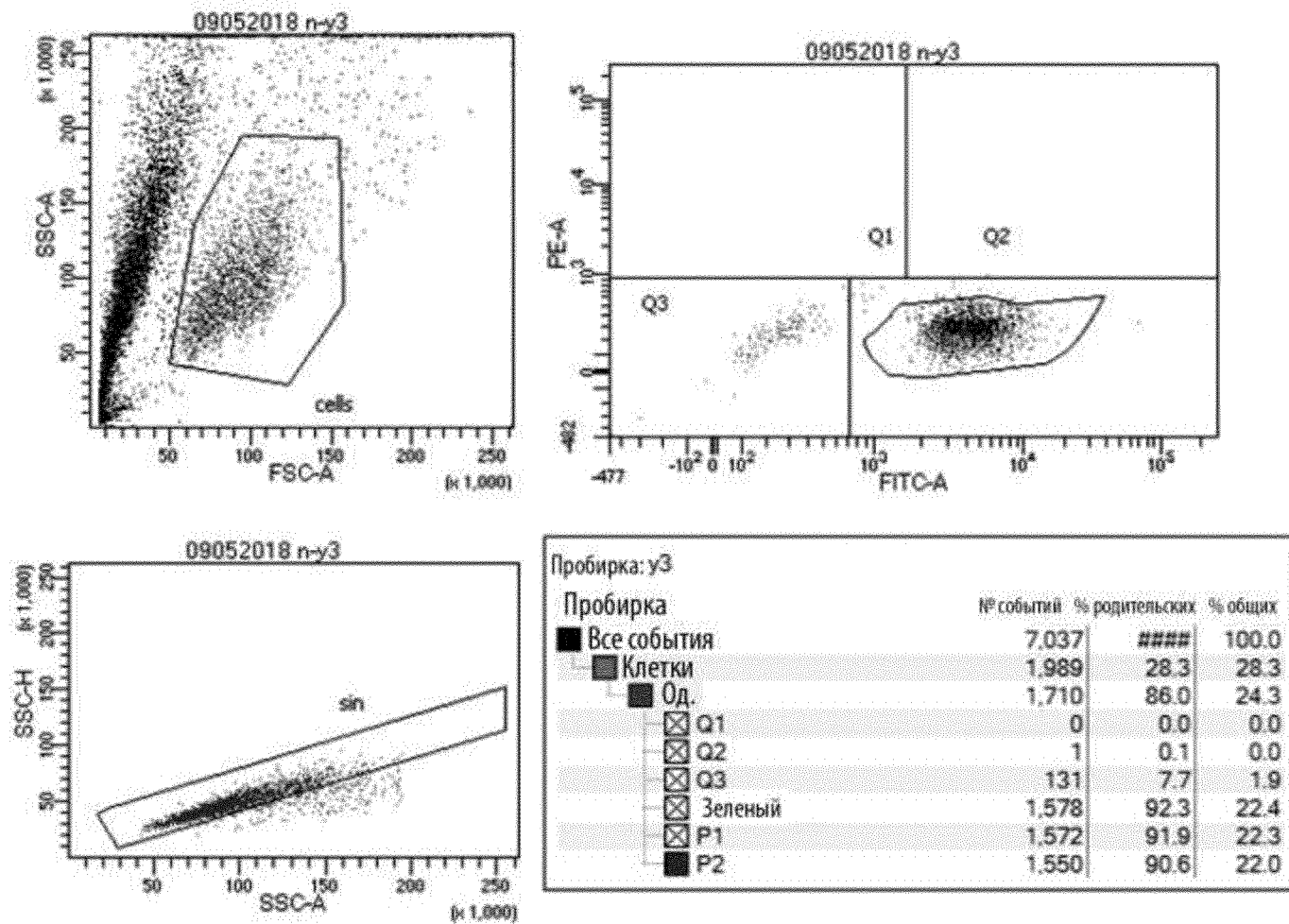
Фиг. 10С



Фиг. 10Д



Фиг. 11А



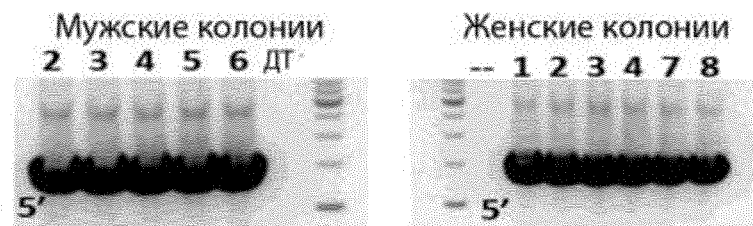
Фиг. 11В



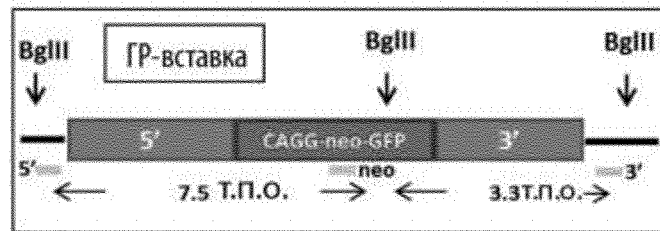
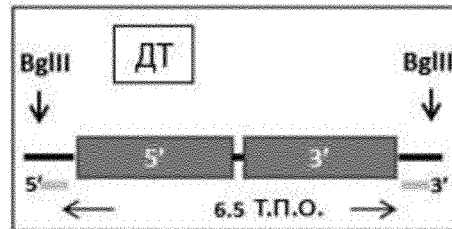
Фиг. 11С



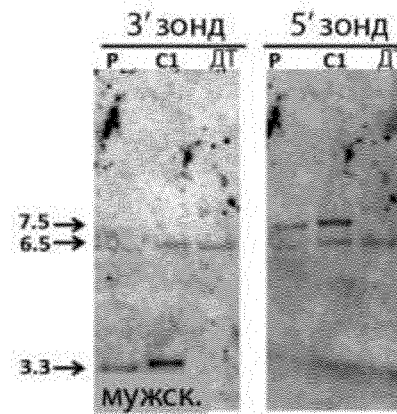
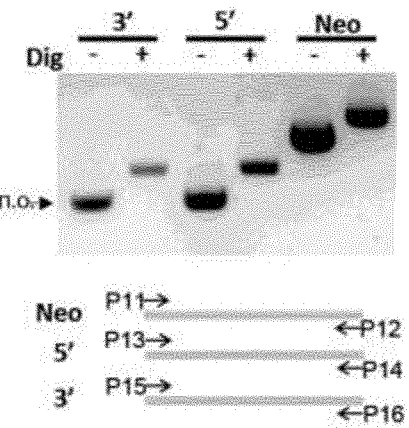
Фиг. 11D



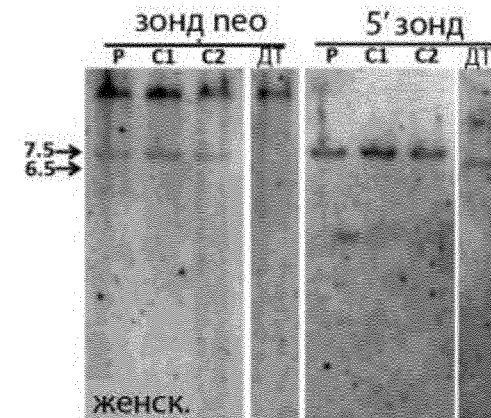
Фиг. 12А



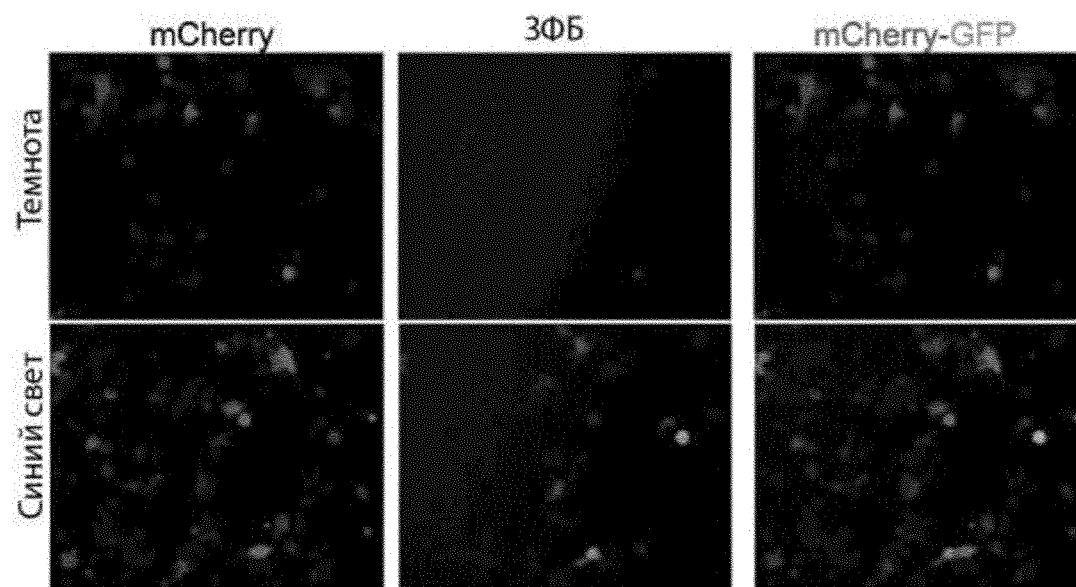
Фиг. 12В



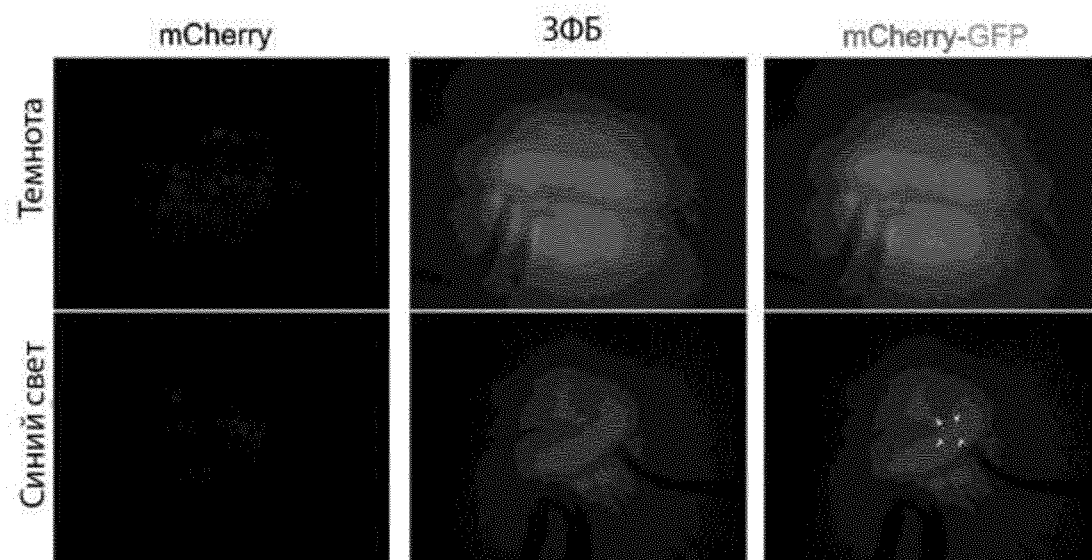
Фиг. 12С



Фиг. 12D



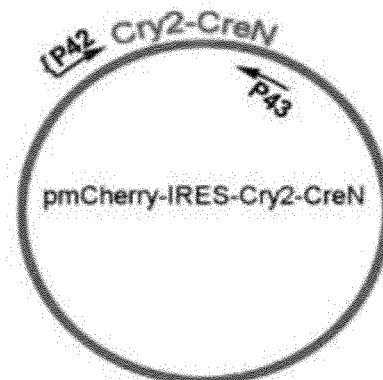
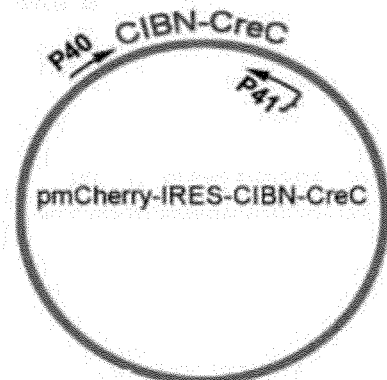
Фиг. 13



16/21

Фиг. 14

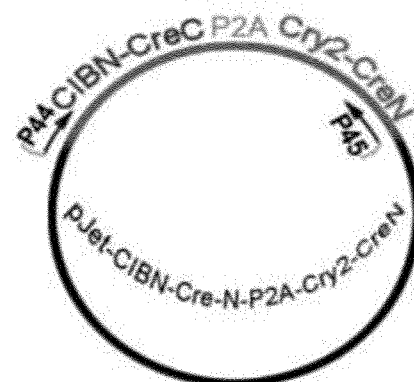
Фиг. 15A



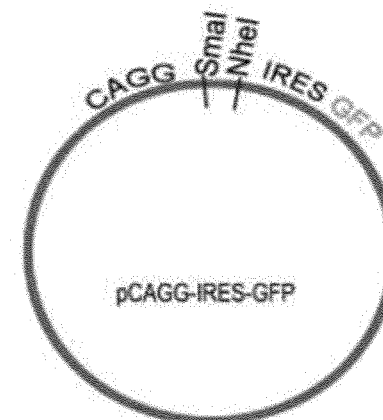
Фиг. 15B



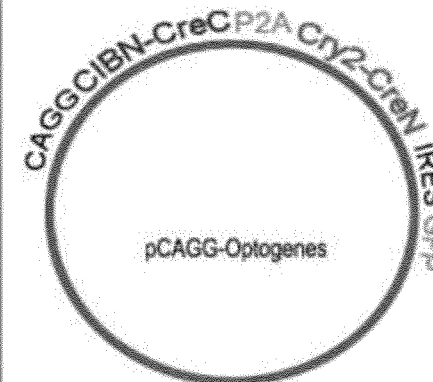
Фиг. 15C



Фиг. 15D

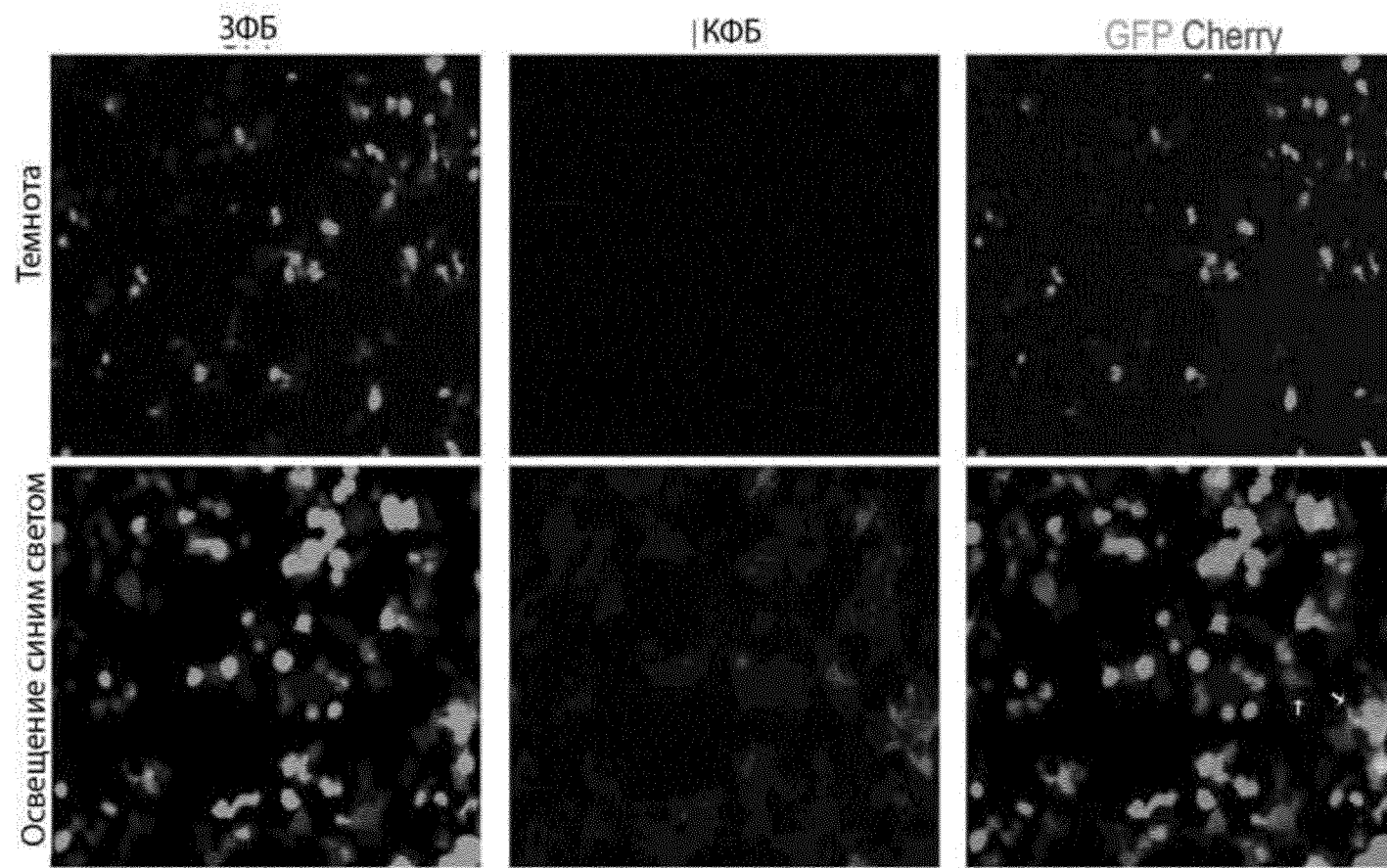


Фиг. 15E

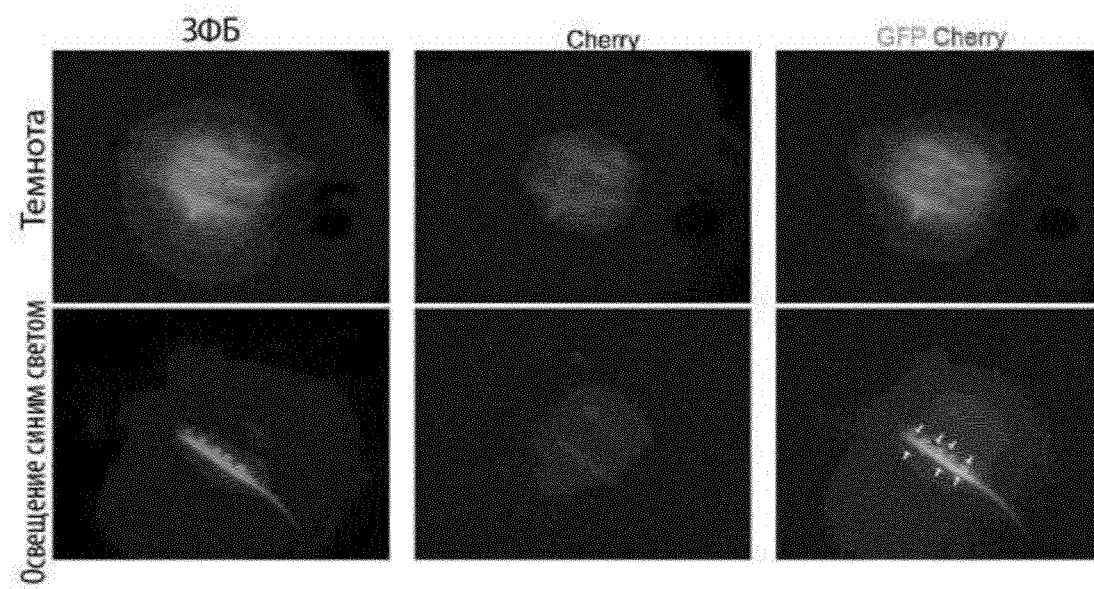


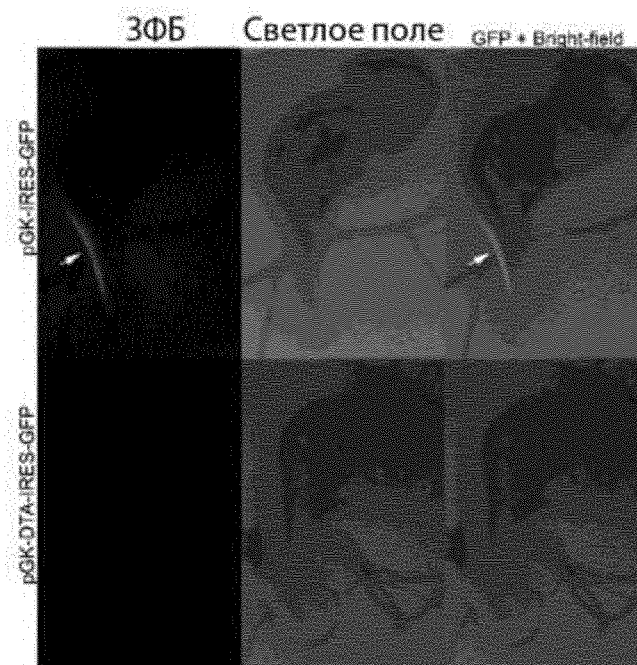
Фиг. 15F

Фиг. 16



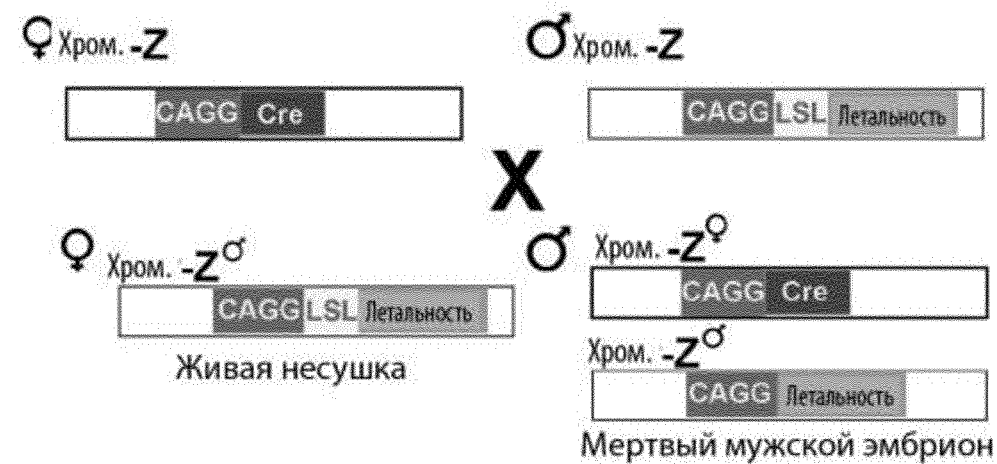
Фиг. 17





Фиг. 18

Фиг. 19A



Фиг. 19B

