

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039787**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.14

(51) Int. Cl. **C12N 15/00** (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

(21) Номер заявки
201790190

(22) Дата подачи заявки
2015.07.14

(54) СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЕ ЖИВОТНОЕ С АБЛЯЦИЕЙ КЛЕТОК ЗАРОДЫШЕВОЙ ЛИНИИ И СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) **62/023,996**

(32) **2014.07.14**

(33) **US**

(43) **2017.10.31**

(86) **PCT/US2015/040379**

(87) **WO 2016/011029 2016.01.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ВАШИНГТОН СТЕЙТ
ЮНИВЕРСИТИ; ЮНИВЕРСИТИ
ОФ МЭРИЛЕНД (US); ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ КОРТ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЭДИНБУРГ (GB)**

(56) **US-A1-20120192298**

SADA et al.: The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells, *Science*, 11 September 2009, vol. 325, № 5946, p. 1394-1398, especially abstract, pg. 1395, col. 2, para 3 continued to pg. 1395, col. 3, para 1

US-A1-20130298269

US-A-5858354

HAI et al.: One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system, *March 2014*, vol. 24, № 3, p. 372-375, especially, pg. 373, col. 2, para 2; pg. 375, col. 1, para 2, GenBank FP102597.2 *Sus scrofa* chromosome 6 clone CH242-173N22, WORKING DRAFT SEQUENCE, 4'unordered pieces [online], 19 August 2009 [retrieved on 4 December 2015], available on the Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/FP102597>, Especially nucleotides 88041-88101.

(72) Изобретатель:
**Оутли Джон Майкл (US), Уайтло
Кристофер Брюс Александр, Лиллико
Саймон Джеффри (GB), Телугу Бхану
Пракаш (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены сельскохозяйственные животные и способы создания реципиентных животных для трансплантации сперматогониальных стволовых клеток с применением модуляции гена NANOS, где животные выбраны из свиньи и крупного рогатого скота. В одном варианте осуществления редактирование генома применяют для создания животных со вставками или делециями (инделами), которые инактивируют или иным образом модулируют активность гена NANOS так, чтобы получаемые в результате самцы не имели функциональных зародышевых клеток, но при этом сохраняли функциональные соматические клетки, а самки являлись фертильными. Затем этим самцам могут трансплантировать донорские сперматогониальные стволовые клетки и применять их для разведения.

B1

039787

039787 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США 62/023996, поданной 14 июля 2014 г., все содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к генетически редактированному, не относящемуся к человеку сельскохозяйственному животному. Способы настоящего изобретения обеспечивают модифицированные гены NANOS у животных, при этом самцы не имеют клеток зародышевой линии, тогда как самки остаются фертильными. Полученные в результате самцы при этом доступны для трансплантации сперматогониальных стволовых клеток и применения в программах селекции.

Уровень техники

Генетическое улучшение домашнего скота может быть описано как улучшение характеристик продуктивности в пределах популяции от поколения к поколению в результате селекции. Применение этого принципа является важным аспектом выращивания животных для производства пищевых продуктов в целях повышения эффективности роста, здоровья животных и качества продукта для потребителя с одновременным уменьшением воздействия на окружающую среду. При выращивании сельскохозяйственных животных большинство генетических улучшений производят при селекционном разведении производителей. Таким образом, повышение доступности спермы от отдельных производителей может значительно влиять на выращивание животных для производства пищевых продуктов в глобальном масштабе. Метод искусственного осеменения (ИО) применялся во всем мире в промышленном выращивании домашнего скота для улучшения характеристик продуктивности. Несмотря на успехи, широкому использованию элитных хряков и быков для ИО в индустрии разведения домашнего скота препятствовали ограничения в абсолютном количестве спермы, которое можно собрать от отдельной особи. У хряков эякулят собирают 1 или 2 раза в неделю, при этом один эякулят дает ~20 доз для ИО. Каждую свиноматку осеменяют 2 или 3 раза в течение данного эстрального цикла. Таким образом, каждую неделю спермой требуемого производителя можно осеменить менее 20 свиноматок. Таким образом, существует значительная потребность в новых способах повышения выхода и доступности гамет от требуемых производителей и сохранения зародышевой линии.

Сперматогенез ежедневно дает миллионы сперматозоидов, при этом основу выработки таких огромных количеств обеспечивает функционирование недифференцированной сперматогониальной популяции, которая содержит сперматогониальные стволовые клетки (ССК). Одним из уникальных свойств ССК является их способность колонизировать семенник животного-реципиента и восстанавливать сперматогенез после трансплантации. Методика трансплантации ССК была разработана для моделей на грызунах, и адаптация данного подхода для свиней обеспечит эффективный инструмент селекции для расширения и сохранения зародышевой линии и генетического качества отдельных производителей. Ключевыми аспектами применения методики трансплантации ССК являются

- 1) выращивание животных-реципиентов, которые не имеют эндогенных половых клеток, но обладают популяциями интактных поддерживающих клеток (т.е. клеток Сертоли и Лейдига);
- 2) размножение относительно редких донорских ССК *in vitro* с получением оптимальных количеств для успешной трансплантации нескольким самцам-реципиентам; и
- 3) инъекция ССК в семенник реципиента.

Эффективность колонизации донорскими ССК зависит от влияния среды, в которой находятся семенники реципиента. Устранение эндогенных половых клеток важно для доступности приживления донорских ССК в семенных канальцах семенников реципиента. Кроме того, сперматогенез регулируется непосредственным взаимодействием между половыми клетками и популяциями поддерживающих клеток семенников, включающих клетки Сертоли и Лейдига. Таким образом, качество соматических клеток во время трансплантации влияет на успех колонизации донорскими ССК. В случае грызунов обработку взрослых самцов химиотоксическими средствами, в особенности алкилирующим средством бусульфаноном, и локальное облучение семенников использовали для эффективной подготовки реципиентов к трансплантации ССК. Хотя обе обработки приводят к истощению эндогенных половых клеток и донорские ССК способны приживаться, они часто оказывают отрицательное воздействие на функцию соматических поддерживающих клеток, при этом некоторые эндогенные половые клетки всегда остаются, что приводит к восстановлению смешенного донорского и эндогенного сперматогенеза. У мышей наиболее успешная трансплантация ССК включает использование реципиентов, которые являются стерильными в результате инактивации генов, требуемых для выживания половых клеток на ранних стадиях сперматогенеза. Частичное выключение сперматогенеза, при котором сохраняется сперматогониальная популяция, не эффективно при подготовке реципиентов. В таком случае все же требуется использовать химиотоксические препараты для устранения сохраняющейся сперматогонии, что позволяет приживаться донорским ССК. Самцы, у которых нарушено выживание первичных половых клеток (ППК), гоноцитов, или ССК, представляют собой идеального реципиента.

В случае свиней и других крупных домашних животных обработка химиотоксическими препаратами для подготовки самцов-реципиентов невозможна из-за необходимости применения высокой дозы

препаратов для полного устранения половых клеток. Такие обработки часто вызывают нежелательные проявления токсичности в отношении стволовых клеток костного мозга и других тканеспецифических стволовых клеток. Кроме того, экскременты и мочу требуется собирать как биологически опасные отходы. Локальное облучение семенников является потенциальной альтернативой, которая преодолевает ограничения терапии химиотоксическими средствами, однако дозу облучения нужно точно регулировать, причем данная процедура вызывает повреждение поддерживающих клеток, в том числе клеток Лейдига, что отрицательно влияет на генерацию донор-производного сперматогенеза. Идеальными реципиентами являются самцы, не имеющие эндогенной зародышевой линии вследствие генетического дефицита, при котором популяция соматических поддерживающих клеток остается функционально интактной.

Как можно заметить, в данной области техники существует потребность в животных, где самец не имеет половых клеток, но сохраняет функциональные соматические клетки и, таким образом, пригоден для трансплантации ССК, тогда как в идеальном варианте самки являются фертильными.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены животные и способы трансплантации сперматогониальных стволовых клеток путем создания животных-реципиентов, у которых модулируют экспрессию NANOS. У животных инактивируют или иным путем модулируют активность гена NANOS, в результате чего самцы не имеют функциональных половых клеток, но при этом сохраняют функциональные соматические клетки, а самки остаются фертильными. Эти животные могут быть созданы с применением любой из множества методик, таких как технология нокаута генов или редактирование генов.

Таким образом, вариантом осуществления изобретения является генетически отредактированное или модифицированное сельскохозяйственное животное, включающее геном с инактивацией гена NANOS, селективного в отношении функции клеток зародышевой линии.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является способ создания сельскохозяйственного животного, включающий введение в клетку сельскохозяйственного животного или эмбрион сельскохозяйственного животного средства, которое специфично связывается с целевым участком хромосомы клетки и вызывает образование двухцепочечного разрыва ДНК или иным образом инактивирует ген NANOS в нем, с применением методов редактирования генов, таких как система CRISPR (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats - кластерные, разделенные регулярными интервалами, короткие палиндромные повторы)/Cas, TALEN (от англ. transcription activator-like effector nucleases - подобные активаторам транскрипции эффекторные нуклеазы), цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) или слитые белки на основе рекомбиназы.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является способ получения самца-донора спермы для селекции сельскохозяйственных животных с нужным генетическим компонентом сперматогониальных стволовых клеток, включающий сбор донорских ССК от требуемого самца-донора, пролиферацию ССК *in vitro* и последующую трансплантацию донорских ССК NANOS2-/- самцу с образованием и сохранением сперматогенных колоний в течение длительного периода времени с донорскими клетками зародышевой линии.

Еще один вариант осуществления изобретения включает получение сельскохозяйственных животных, включающее естественное спаривание и/или искусственное осеменение самок сельскохозяйственных животных донорской спермой от NANOS2-/- самца-реципиента.

Также в настоящей заявке описано применение одного или более определенных локусов NANOS в тандеме с полипептидом, способным обеспечивать расщепление и/или интеграцию определенных последовательностей нуклеиновых кислот в локусах NANOS. Примеры применения локусов NANOS в тандеме с полипептидом, способным обеспечивать расщепление и/или интеграцию локусов NANOS, включают полипептид, выбранный из группы, состоящей из цинк-пальцевых белков, мегануклеаз, TAL доменов, нуклеаз TALEN, РНК-направляемых CRISPR/Cas-рекомбиназ, лейциновых молний и других, известных специалистам в данной области техники. Конкретные примеры включают химерный ("слитый") белок, включающий полипептид с сайт-специфическим ДНК-связывающим доменом и полипептид с расщепляющим доменом (например, нуклеазу), такой как ZFN белок, включающий полипептид с цинковыми пальцами и полипептид нуклеазы FokI. В некоторых аспектах, описанных в настоящей заявке, полипептиды включают ДНК-связывающий домен, который специфично связывается с геном NANOS. В некоторых вариантах осуществления такой полипептид может также включать нуклеазный (расщепляющий) домен или полудомен (например, ZFN, рекомбиназы, транспозазы или хоминг-эндонуклеазы, включающей хоминг-эндонуклеазу с модифицированным ДНК-связывающим доменом, TAL доменами, нуклеазами TALEN, РНК-направляемой CRISPR/Cas), и/или лигазный домен, при этом полипептид может вызывать направленное образование двухцепочечного разрыва и/или способствовать рекомбинации представляющей интерес нуклеиновой кислоты на участке разрыва. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен, который направлен на locus NANOS, может быть ДНК-расщепляющим функциональным доменом. Предыдущие полипептиды могут применяться в некоторых вариантах осуществления для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в геном организма-хозяина (например, вида животного) в одном или более локусах NANOS. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающие домены включают цинк-пальцевый белок с одним или более цинковыми пальцами

(например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более цинковыми пальцами), который сконструирован (не встречается в природе) для связывания с любой последовательностью в гене NANOS. Любой из цинк-пальцевых белков, описанных в настоящей заявке, может связываться с целевым участком в кодирующей последовательности гена-мишени или в смежных последовательностях (например, в промоторе или других элементах экспрессии). В некоторых вариантах осуществления цинк-пальцевый белок связывается с целевым участком в гене NANOS, например приблизительно 20 оснований в экзоне 1.

Другие варианты осуществления станут очевидными из подробного описания изобретения, которое представлено ниже.

Описание фигур

Фиг. 1 является совмещением множественного выравнивания последовательностей свиных геномов для идентификации потенциальных однонуклеотидных полиморфизмов в свином гене NANOS2 (обозначенных точками), которое может информативно использоваться при создании реагентов для редактирования генома.

На фиг. 2 показаны результаты расщепленных продуктов ПЦР в агарозном геле для идентификации событий NHEJ. Геномную ДНК получали из клеток PK15, трансфицированных плазмидами, кодирующими TALEN пары A, B или C, затем амплифицировали с ПЦР-праймерами oSL9 и oSL10. Ошибочное спаривание идентифицировали при расщеплении ферментом Cell.

На фиг. 3A, 3B и 3C показана последовательность направляющей РНК-связывающей последовательности (SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16). На фиг. 3C показана конструкция с гидами, промотором U6 человека, онРНК-связывающей последовательностью и терминаторной последовательностью. А также последовательность промотора U6 (SEQ ID NO: 18), последовательность-мишень (SEQ ID NO: 19), каркас нРНК (SEQ ID NO: 20), концевая последовательность (SEQ ID NO: 21).

На фиг. 4 показаны расщепленные ПЦР-продукты в агарозном геле свиной CRISPR/Cas9, действующей на ДНК из клеток PK15. Три плазмиды, кодирующие последовательность онРНК, CAG-направляемой Cas9 и CMV-направляемого eGFP, соответственно, трансфицировали в клетки PK15. ПЦР проводили на полученной геномной ДНК с праймерами oSL9 и oSL10. Расщепленные продукты ПЦР разделяли в 2% агарозном TAE геле. Хотя обе направляющие последовательности приводили к разрезанию и образованию NHEJ на целевом участке (что подтверждалось присутствием продуктов расщепления после обработки Cell, нижние две стрелки справа), неожиданно было обнаружено, что последовательность онРНК в обратной ориентации относительно кодирующей последовательности была значительно более эффективной, чем ее смысловая копия.

Фиг. 5A является картой плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458).

На фиг. 5B показано расположение неполной последовательности pX458 (SEQ ID NO: 22), последовательности hU6 (SEQ ID NO: 23), последовательности нРНК (SEQ ID NO: 24), концевой последовательности (SEQ ID NO: 25).

На фиг. 5C1-5C3 показана полная последовательность конструкции (SEQ ID NO: 43).

На фиг. 6A и 6B представлен гель ПЦР-продуктов геномной ДНК после трансфекции и показаны существенные различия в эффективности, с которой онРНК были способны вызывать образование NHEJ на своем целевом участке, на что указывает присутствие продуктов расщепления T7 эндонуклеазой (стрелки справа от дорожек 32, 33, 38-41, 42 и 49).

На фиг. 7 показаны делеции, образованные при использовании различных комбинаций CRISPR. На фото показан гель геномной ДНК, если инделы амплифицированы с праймерами oSL86 (SEQ ID NO: 64) и oSL87 (SEQ ID NO: 74) шести комбинаций плазмид.

На фиг. 8 показаны последовательности бычьих инделов по сравнению с диким типом (WT).

pSL32 и pSL38: WT (SEQ ID NO:117), Клон 1 (SEQ ID NO:118); КЛОН 2 (SEQ ID NO:119); КЛОН 3 (SEQ ID NO:120); КЛОН 4 (SEQ ID NO:121); КЛОН 5 (SEQ ID NO:122).

pSL32 и pSL39: WT (SEQ ID NO:123), Клон 1 (SEQ ID NO:124); КЛОН 2 (SEQ ID NO:125); КЛОН 3 (SEQ ID NO:126); КЛОН 4 (SEQ ID NO:127); КЛОН 5 (SEQ ID NO:128).

pSL32 и pSL42: WT (SEQ ID NO:129), Клон 1 (SEQ ID NO:130); КЛОН 2 (SEQ ID NO:131); КЛОН 3 (SEQ ID NO:132); КЛОН 4 (SEQ ID NO:133); КЛОН 5 (SEQ ID NO:134).

pSL33 и pSL38: WT (SEQ ID NO:135), Клон 1 (SEQ ID NO:136); КЛОН 2 (SEQ ID NO:137); КЛОН 3 (SEQ ID NO:138); КЛОН 4 (SEQ ID NO:139); КЛОН 5 (SEQ ID NO:140).

pSL33 и pSL39: WT (SEQ ID NO:141), Клон 1 (SEQ ID NO:142); КЛОН 2 (SEQ ID NO:143); КЛОН 3 (SEQ ID NO:144); КЛОН 4 (SEQ ID NO:145); КЛОН 5 (SEQ ID NO:146).

pSL33 и pSL42: WT (SEQ ID NO:147), Клон 1 (SEQ ID NO:148); КЛОН 2 (SEQ ID NO:149); КЛОН 3 (SEQ ID NO:150); КЛОН 4 (SEQ ID NO:151); КЛОН 5 (SEQ ID NO:152).

На фиг. 9 показан CRISPR-опосредованный генный таргетинг локуса NANOS2 в свиных эмбрионах.

А) Схема промотора CMV для экспрессии в млекопитающих и T7 для *in vitro* транскрипции вектора экспрессии Cas9:GFP: HA метка и NLS: сигнал ядерной локализации для ядерной локализации экспрессированного белка нуклеазы Cas9. Кассета экспрессии химерной одиночной направляющей РНК (онРНК) под контролем промотора T7, несущая направляющую РНК и Cas9-связывающую последовательность.

В) Схема Cas9 онРНК-опосредованного таргетинга предполагаемой геномной последовательности.

С) Снимок флуоресцентной микроскопии свиных 1-клеточных эмбрионов без инъекции (справа) или после инъекции (слева) РНК и из обеих кассет панели А (Cas9:GFP и гид) в день 2 с подтверждением экспрессии Cas9:GFP. Светлопольные изображения развивающихся эмбрионов показаны во вставке.

Д) Секвенирование эмбрионов после инъекции демонстрирует различные степени инделов, которые часто были биаллельными. Последовательность дикого типа показана в верхней полосе, при этом выделенные последовательности соответствуют целевой направляющей последовательности (подчеркнута) и РАМ мотиву (AGG, подчеркнута пунктирной линией) в обратной ориентации.

NANOS2 (SEQ ID NO:29); N1-1 (SEQ ID NO:30);
 N1-2 (SEQ ID NO:31); N3-2 (SEQ ID NO:32); N3-3 (SEQ ID NO:33);
 N5-2 (SEQ ID NO:34); N5-3 (SEQ ID NO:35); N6-1 (SEQ ID NO:36);
 N7-2 (SEQ ID NO:37); N7-3 (SEQ ID NO:38); N10-2 (SEQ ID NO:39);
 N11-2 (SEQ ID NO:40); N12-2 (SEQ ID NO:41) N12-3 (SEQ ID NO:42).

На фиг. 10А показано секвенирование свиных эмбрионов после инъекции двух онРНК. Как показано на фигуре, инъекции двух онРНК приводили к делеции большого сегмента локуса NANOS2 и вставке посторонней последовательности (подчеркнута) в аллели NANOS2.

NANOS (SEQ ID NO:26); NN6-1 (SEQ ID NO:27); NN7-1 и NN7-2 (SEQ ID NO:28).

На фиг. 10В показана другая последовательность индела из бластоцист

NANOS (SEQ ID NO:44); N3-1-3 (SEQ ID NO:45); N3-2-3 (SEQ ID NO:46); N3-6-2 (SEQ ID NO:47); N3-7-3 (SEQ ID NO:48);
 N3-8-3 (SEQ ID NO:49); N3-10-2 (SEQ ID NO:50); N3-12-2 (SEQ ID NO:51); N3-12-3 (SEQ ID NO:52).

На фиг. 11 показана пара (никазная пара) одиночных направляющих РНК, созданных для воздействия на противоположные цепи. Обе онРНК выделены на фигуре рамкой, при этом обратная цепь отмечена фигурной скобкой. Мотивы РАМ обеих онРНК подчеркнуты пунктирной линией. Вокруг целевого участка модификации не обнаружили.

онРНК1 (SEQ ID NO:53); онРНК2 (SEQ ID NO:54); NANOS (SEQ ID NO:55); N2-3 (SEQ ID NO:56); N3-1 (SEQ ID NO:57); N4-2 (SEQ ID NO:58); N5-2 (SEQ ID NO:59); N6-3 (SEQ ID NO:60); N7-1 (SEQ ID NO:61).

На фиг. 12 показаны последовательность бычьего NANOS2 с указанием подобранных гидов и праймеров. Полная нуклеотидная последовательность

(SEQ ID NO:62); NANOS 2 CDS (SEQ ID NO:63);
 oSL86 (SEQ ID NO:64); pSL36 или 37 (SEQ ID NO:65); pSL34 или 35
 (SEQ ID NO:66); pSL32 или 33 (SEQ ID NO:67); pSL38 или 39 (SEQ
 ID NO:68); pSL39 или 40 (SEQ ID NO:69); pSL41 или 42 (SEQ ID
 NO:70); pSL43 или 44 (SEQ ID NO:71); pSL45 или 46 (SEQ ID
 NO:72); pSL47 или 48 (SEQ ID NO:73); oSL87 (SEQ ID NO:74).

На фиг. 13 показан способ с применением системы CRISPR/Cas для получения моно- или биаллельных поросят с нокаутом NANOS2. Последовательность гида длиной 20 нуклеотидов подчеркнута, а PAM мотив подчеркнут пунктирной линией (примечание: гид находится в обратной ориентации). Последовательность-мишень CRISPR подчеркнута в ORF NANOS2. Также показаны CRISPR последовательность РНК-гида (SEQ ID NO: 160), ORF NANOS2 (SEQ ID NO: 1 и 2), последовательность-мишень CRISPR (SEQ ID NO: 161).

На фиг. 14A и 14B показаны генотипы поросят с CRISPR/Cas-опосредованным моно или биаллельным нокаутом NANOS2.

WT NANOS (SEQ ID NO:163);
 NANOS свинья 1-1 (SEQ ID NO:164); NANOS свинья
 1-2 (SEQ ID NO:165); NANOS свинья 1-3 (SEQ ID NO:166); NANOS
 свинья 2-1 (SEQ ID NO:167); NANOS свинья 2-4 (SEQ ID NO:168);
 NANOS свинья 3-1 (SEQ ID NO:169); NANOS свинья 4-1 (SEQ ID
 NO:170); NANOS свинья 4-2 (SEQ ID NO:171); NANOS свинья 10-1
 (SEQ ID NO:172); NANOS свинья 10-2 (SEQ ID NO:173); NANOS свинья
 11-1 (SEQ ID NO:174); NANOS свинья 11-4 (SEQ ID NO:175); NANOS
 свинья 12-1 (SEQ ID NO:176); NANOS свинья 12-2 (SEQ ID NO:177);
 NANOS поросенок #1 Аллель-1 (SEQ ID NO:178); NANOS поросенок #1
 Аллель-2 (SEQ ID NO:179); NANOS поросенок #2 Аллель-1 (SEQ ID
 NO:180); NANOS поросенок #2 Аллель-2 (SEQ ID NO:181); NANOS
 поросенок #3 Аллель-1 (SEQ ID NO:182); NANOS поросенок #3
 Аллель-2 (SEQ ID NO:183); NANOS поросенок #4 Аллель-1 (SEQ ID
 NO:184); NANOS поросенок #4 Аллель-2 (SEQ ID NO:185); NANOS
 поросенок #5 Аллель-1 (SEQ ID NO:186); NANOS поросенок #5
 Аллель-2 (SEQ ID NO:187); NANOS поросенок #6 Аллель-1 (SEQ ID
 NO:188); NANOS поросенок #6 Аллель-2 (SEQ ID NO:189); NANOS
 поросенок #7 Аллель-1 (SEQ ID NO:190); NANOS поросенок #7
 Аллель-2 (SEQ ID NO:191); NANOS поросенок #8 Аллель-1 (SEQ ID
 NO:192); NANOS поросенок #8 Аллель-2 (SEQ ID NO:193); NANOS
 поросенок #9 Аллель-1 (SEQ ID NO:194); NANOS поросенок #9
 Аллель-2 (SEQ ID NO:195); NANOS поросенок #10 Аллель-1 (SEQ ID
 NO:196); NANOS поросенок #10 Аллель-2 (SEQ ID NO:197); NANOS
 поросенок #11 Аллель-1 (SEQ ID NO:198); NANOS поросенок #11
 Аллель-2 (SEQ ID NO:199).

На фиг. 15 показаны генотипы поросят, NANOS2-нулевых самцов и самок, полученных с помощью SCNT. На фигуре направляющая последовательность длиной 20 нуклеотидов, направленная против NANOS2 (SEQ ID NO: 162), подчеркнута, при этом за ней расположен 3 нт PAM мотив (подчеркнут пунктирной линией). У нокаутных самцов оба аллеля имеют 7 нт делеции в ORF NANOS2, которые вызывают прерывание гена NANOS2. У самок один аллель имеет 1 нт делецию и несколько измененных нуклеотидных последовательностей и второй аллель имеет 11 нт делецию. В совокупности указанные аллели делают самок нулевыми по NANOS2.

На фиг. 16 показано репрезентативное изображение срезов биоптата семенников NANOS2 гомозиготных нокаутных свиней возрастом 3 месяца. Изображение срезов биоптата было получено при использовании световой микроскопии, при этом показаны интактные семенные шнуры и присутствие соматических поддерживающих клеток. Кроме того, на фиг. 16 показано отсутствие множественных слоев половых клеток внутри шнуров.

Подробное описание изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на сопутствующие примеры. Изобретение может быть осуществлено во многих различных формах и не должно считаться ограниченным вариантами осуществления, представленными в настоящей заявке; скорее эти варианты осуществления приведены таким образом, чтобы настоящее описание соответствовало действующему законодательству.

Множество модификаций и других вариантов осуществления изобретения придут на ум специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение, обладая преимуществами принципов, представленных в описаниях и чертежах в настоящей заявке. В результате необходимо понимать, что изобретение не должно ограничиваться определенными раскрытыми вариантами осуществления и что модификации и другие варианты осуществления должны быть включены в объем прилагаемой формулы изобретения. Хотя в настоящем описании используются определенные термины, они используются исключительно в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения.

Единицы, префиксы и символы могут быть обозначены в их принятой форме в системе СИ. Если не указано иное, порядок написания нуклеиновых кислот соответствует направлению слева направо в ориентации от 5' к 3'; порядок написания аминокислотных последовательностей соответствует направлению слева направо в ориентации от N- к C-концу соответственно. Числовые диапазоны, указанные в описании, содержат числа, определяющие диапазон, и включают каждое целое число в пределах определенного диапазона. Аминокислоты могут быть указаны в настоящем описании либо своими общеизвестными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды аналогично могут быть указаны своими общепринятыми однобуквенными кодами. Если не предусмотрено иное, термины программирования, электротехники и электроники, используемые в настоящем описании, соответствуют определениям в New IEEE Standard Dictionary of Electrical and Electronics Terms (5th edition, 1993). Термины, определенные ниже, более полно определены в соответствии с настоящим описанием в целом.

Под "амплифицированной" понимается создание множества копий последовательности нуклеиновой кислоты или множества копий, комплементарных последовательности нуклеиновой кислоты, при использовании по меньшей мере одной из последовательностей нуклеиновых кислот в качестве матрицы. Системы амплификации включают систему полимеразной цепной реакции (ПЦР), систему лигазной цепной реакции (ЛЦР), амплификацию на основе последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA, Cagne, Mississauga, Ontario), системы на основе Q-бета репликазы, систему амплификации на основе транскрипции (TAS) и амплификацию с замещением цепи (SDA). См., например, Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, D.H. Persing et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). Продукт амплификации называют ампликоном.

Термин "консервативно модифицированные варианты" относится и к аминокислотным последовательностям, и к последовательностям нуклеиновых кислот. В отношении конкретных последовательностей нуклеиновых кислот "консервативно модифицированные варианты" относятся к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или консервативно модифицированные варианты аминокислотных последовательностей. Вследствие вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует тот или иной белок. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором кодоном определяется аланин, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот являются "молчащими вариациями" и представляют одну из разновидностей консервативно модифицированной вариации. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем описании, которая кодирует полипептид в соответствии с генетическим кодом, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты.

Среднему специалисту будет известно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и UGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид настоящего изобретения, подразумевается в каждой описанной последовательности полипептида и включена в объем настоящего изобретения.

В отношении аминокислотных последовательностей специалисту будет известно, что отдельные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые вызывают изменение, добавление или удаление одной аминокислоты или небольшого процента аминокислот в кодируемой последовательности, соответствуют "консервативно модифицированному варианту", в котором изменение приводит к замене аминокислоты химически подобной аминокислотой. Таким образом, любое количество аминокислотных остатков, выбранное из группы целых чисел, состоящей из 1-15, может быть изменено таким путем. Таким образом, может быть сделано, например, 1, 2, 3, 4, 5, 7 или 10 изменений.

Консервативно модифицированные варианты обычно обеспечивают подобную биологическую ак-

тивность, что и немодифицированная последовательность полипептида, из которой они получены. Например, субстратная специфичность, ферментная активность или связывание лиганда/рецептора обычно составляют по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% от показателей нативного белка в отношении его нативного субстрата. Таблицы консервативных замен, дающих функционально подобные аминокислоты, известны в уровне техники.

Каждая из следующих шести групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга:

- [1] Аланин (A), Серин (S), Треонин (T);
- [2] Аспарагиновая кислота (D), Глутаминовая кислота (E);
- [3] Аспарагин (N), Глутамин (Q);
- [4] Аргинин (R), Лизин (K);
- [5] Изолейцин (I), Лейцин (L), Метионин (M), Валин (V); и
- [6] Фенилаланин (F), Тирозин (Y), Триптофан (W).

См. также Creighton (1984) Proteins W.H. Freeman and Company.

Под "кодирующей" или "кодируемой" в отношении указанной нуклеиновой кислоты подразумевается включающая информация для трансляции в указанный белок. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок, может включать промежуточные последовательности (например, интроны) в транслируемых областях нуклеиновой кислоты или может не иметь таких промежуточных нетранслируемых последовательностей (например, как в кДНК). Информация, которая кодирует белок, определяется посредством кодонов. Как правило, аминокислотная последовательность кодируется нуклеиновой кислотой при помощи "универсального" генетического кода. В случае когда нуклеиновая кислота получена или изменена синтетически, может быть использовано преимущество известных предпочтений по кодомам в предполагаемом организме-хозяине, в котором должна экспрессироваться нуклеиновая кислота.

При использовании в настоящем описании "полноразмерная последовательность" в отношении указанного полинуклеотида или соответствующего кодируемого белка означает имеющую полную аминокислотную последовательность нативной (несинтетической), эндогенной, биологически активной формы указанного белка.

Способы определения, является ли последовательность полноразмерной, известны в уровне техники, включая такие примерные методики как Нозерн или Вестерн-блоттинг, удлинение праймеров, защита от S1 и защита от рибонуклеазы. Сравнение с известными полноразмерными гомологичными (ортологичными и/или паралогичными) последовательностями также может использоваться для идентификации полноразмерных последовательностей настоящего изобретения. Кроме того, консенсусные последовательности, которые обычно присутствуют в 5'- и 3'-нетранслируемых областях мРНК, способствуют идентификации полинуклеотида как полноразмерного. Например, консенсусная последовательность ANNNNAUGG, где подчеркнутый кодон соответствует N-концевому метионину, способствует определению, имеет ли полинуклеотид полный 5'-конец. Консенсусные последовательности на 3'-конец, такие как последовательности полиаденилирования, способствуют определению, имеет ли полинуклеотид полный 3'-конец.

При использовании в настоящем описании "гетерологичный" в отношении нуклеиновой кислоты соответствует нуклеиновой кислоте, которая происходит из чужеродного биологического вида или, в случае если она происходит из того же биологического вида, по существу модифицирована по сравнению с ее нативной формой по составу и/или геномному локусу в результате преднамеренного вмешательства человека. Например, промотор, который функционально связан с гетерологичным структурным геном, происходит из биологического вида, отличного от биологического вида, из которого был получен структурный ген или, в случае если он происходит из того же биологического вида, один или оба по существу модифицированы по сравнению с их исходной формой. Гетерологичный белок может происходить из чужеродного биологического вида или, в случае если он происходит из того же биологического вида, по существу модифицирован по сравнению с его исходной формой в результате преднамеренного вмешательства человека.

Под "клеткой-хозяином" подразумевается клетка, которая содержит вектор и поддерживает репликацию и/или экспрессию вектора. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками, такими как *E. coli*, или эукариотическими клетками, такими как клетки дрожжей, насекомых, амфибий или млекопитающих.

Термин "гибридизационный комплекс" включает ссылку на структуру двухцепочечной нуклеиновой кислоты, которая образована двумя одноцепочечными последовательностями нуклеиновых кислот, селективно гибридованными друг с другом.

Термин "введенный" в отношении вставки нуклеиновой кислоты в клетку эквивалентен "трансфекции", или "трансформации", или "трансдукции" и включает ссылку на включение нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где нуклеиновая кислота может быть включена в геном клетки (например, хромосому, плазмиду, пластидную или митохондриальную ДНК), превращена в автономный репликон или транзientно экспрессирована (например, трансфицированная мРНК).

Термин "выделенный" относится к материалу, такому как нуклеиновая кислота или белок, который

(1) по существу или практически не содержит компонентов, которые обычно сопровождают или взаимодействуют с ним как в его естественном окружении, причем выделенный материал необязательно включает материал, не обнаруживаемый с таким материалом в его окружении; или

(2) в случае если материал находится в своем окружении, материал был синтетически изменен в результате преднамеренного вмешательства человека по составу и/или помещен в такое положение в клетке (например, геном или субклеточную органеллу), которое не является нативным для данного материала.

Изменение с целью получения синтетического материала может быть выполнено в отношении материала, находящегося в или удаленного из его естественного состояния. Например, природная нуклеиновая кислота становится выделенной нуклеиновой кислотой, если она изменена или если она транскрибирована с ДНК, которая была изменена посредством вмешательства человека, выполненного в клетке, из которой она происходит. См., например, *Compounds and Methods for Site Directed Mutagenesis in Eukaryotic Cells*, Kmiec, U.S. Patent No. 5,565,350; *In Vivo Homologous Sequence Targeting in Eukaryotic Cells*; Zarling et al., PCT US 93/03868. Аналогично природная нуклеиновая кислота (например, промотор) становится выделенной, если она введена с помощью не встречающихся в природе средств в локус генома, который не является нативным по отношению к данной нуклеиновой кислоте. Нуклеиновые кислоты, которые были "выделены", как определено в настоящей заявке, также называются "гетерологичными" нуклеиновыми кислотами.

При использовании в настоящем описании "локализованный в хромосомной области, определенной и включающей" в отношении конкретных маркеров включает ссылку на непрерывную длину хромосомы, ограниченной и включающей указанные маркеры.

При использовании в настоящем описании "маркер" включает ссылку на локус на хромосоме, который служит для идентификации уникального положения на хромосоме. "Полиморфный маркер" включает ссылку на маркер, который появляется во множественных формах (аллелях) таким образом, что различные формы маркера, в случае их присутствия в гомологичной паре, позволяли бы наследовать каждую из хромосом этой пары. Генотип может быть определен при помощи одного или множества маркеров.

При использовании в настоящем описании "мутация" включает ссылку на изменения в нуклеотидной последовательности полинуклеотида, такого как, например, ген или кодирующая последовательность ДНК (CDS), по сравнению с последовательностью дикого типа. Термин включает, без ограничения, замены, вставки, сдвиги рамки считывания, делеции, инверсии, транслокации, дупликации, мутации донорных сайтов сплайсинга, точечные мутации или подобное.

При использовании в настоящем описании "нуклеиновая кислота" включает ссылку на дезоксирибонуклеотидный или рибонуклеотидный полимер в одно- или двухцепочечной форме и, если нет иных ограничений, охватывает консервативно модифицированные варианты и известные аналоги, обладающие существенными свойствами природных нуклеотидов в том отношении, что они гибридизируются с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами аналогично природным нуклеотидам (например, пептид-нуклеиновые кислоты).

Под "библиотекой нуклеиновых кислот" подразумевается коллекция выделенных молекул ДНК или РНК, которые включают и по существу представляют собой всю транскрибируемую фракцию генома указанного организма. Создание примеров библиотек нуклеиновых кислот, таких как библиотеки геномной и кДНК, описано в стандартных источниках в области молекулярной биологии, таких как

Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning—A Laboratory Manual, 2nd ed., Vol. 1-3 (1989); и Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., Eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (1994).

При использовании в настоящем описании "функционально связанный" включает ссылку на функциональную связь между промотором и второй последовательностью, где последовательность промотора инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Как правило, "функционально связанный" означает, что связываемые последовательности нуклеиновых кислот примыкают друг к другу и при необходимости соединяют две кодирующие белок области непрерывно и в одной рамке считывания.

При использовании в настоящем описании "полинуклеотид" включает ссылку на дезоксирибополинуклеотид, рибополинуклеотид или консервативно модифицированные варианты. Термин также может относиться к их аналогам, которые обладают существенными свойствами природных нуклеотидов в том отношении, что они гибридизируются в жестких условиях гибридизации по существу с такой же нуклеотидной последовательностью, что и природные нуклеотиды, и/или позволяют транскрипцию в ту же ами-

нокислоту(ы), что и природный нуклеотид(ы). Полинуклеотид может быть полноразмерным или являться подпоследовательностью нативного или гетерологичного структурного или регуляторного гена. Если не указано иное, термин включает ссылку на указанную последовательность, а также ее комплементарную последовательность. Таким образом, ДНК или РНК, скелеты которых модифицированы в целях стабильности или по другим причинам, являются "полинуклеотидами" в том отношении, в каком данный термин предусматривается в настоящем описании. Кроме того, ДНК или РНК, включающие нестандартные основания, такие как инозиновые, или модифицированные основания, такие как тритилированные основания (и это всего лишь два примера), являются полинуклеотидами в том отношении, в каком данный термин используется в настоящем описании. Следует понимать, что в ДНК и РНК был сделан целый ряд модификаций, которые служат многим полезным целям, известным специалистам в данной области техники.

Термин полинуклеотид при использовании в настоящем описании охватывает химически, ферментно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток, включая, среди прочего, простые и сложные клетки.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" попеременно используются в настоящем описании для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины также могут относиться к консервативно модифицированным вариантам и полимерам из аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственным химическим аналогом соответствующей природной аминокислоты, а также к природным полимерам из аминокислот. Существенным свойством таких аналогов природных аминокислот является то, что при включении в белок белок специфично реагирует с антителами, индуцированными против такого же белка, но состоящими полностью из природных аминокислот. Термины "полипептид", "пептид" и "белок" также включают модификации, включающие, без ограничения, гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксиглирование и ДЦФ-рибозилирование. Следует понимать, как известно и как отмечено выше, что полипептиды не всегда являются полностью линейными. Например, полипептиды могут разветвляться в результате убиквитинирования и могут быть кольцевыми, с разветвлением или без, обычно в результате посттрансляционных событий, включая природный процессинг и события, вызванные манипуляцией человека, которые не происходят в природе. Кольцевые, разветвленные и разветвленные кольцевые полипептиды могут быть синтезированы в результате нетрансляционного природного процесса, а также полностью синтетическими методами. Кроме того, в настоящем изобретении рассматривается применение метионинсодержащих и не имеющих N-концевого метионина вариантов белка изобретения.

При использовании в настоящем описании "промотор" включает ссылку на область ДНК, расположенную перед началом транскрипции и участвующую в распознавании и связывании РНК-полимеразы и других белков для инициации транскрипции. Примеры промоторов, зависящих от развития, включают промоторы, которые предпочтительно иницируют транскрипцию в определенных тканях, таких как семенники, яичники или плацента. Такие промоторы называются "тканепредпочтительными". Промоторы, которые иницируют транскрипцию только в определенной ткани, называются "тканеспецифическими". Промотор, специфичный для одного "типа клеток", преимущественно направляет экспрессию в определенных типах клеток в одном или более органах, например половых клетках в семенниках или яичниках. "Индукцируемый" или "репрессируемый" промотор является промотором, который находится под контролем условий окружающей среды. Примеры условий окружающей среды, которые могут воздействовать на транскрипцию, регулируемую индуцируемыми промоторами, включают стресс и температуру. Тканеспецифические, тканепредпочтительные, специфичные для одного типа клеток и индуцируемые промоторы составляют класс "неконститутивных" промоторов. "Конститутивный" промотор является промотором, который активен при большинстве условий окружающей среды.

При использовании в настоящем описании "рекомбинантный" включает ссылку на клетку или вектор, которые были модифицированы путем введения гетерологичной нуклеиновой кислоты, или ссылку, что клетка получена из клетки, модифицированной таким способом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не присутствуют в идентичной форме в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые в иных условиях аномально экспрессируются, пониженно экспрессируются или не экспрессируются вообще в результате преднамеренного вмешательства человека. Термин "рекомбинантный" при использовании в настоящем описании не охватывает изменение клетки или вектора в результате природных событий (например, спонтанной мутации, природной трансформации/трансдукции/транспозиции), таких как события, которые происходят без преднамеренного вмешательства человека.

При использовании в настоящем описании "рекомбинантная кассета экспрессии" является конструкцией нуклеиновой кислоты, полученной рекомбинантно или синтетически, с набором определенных элементов нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают транскрипцию конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Рекомбинантная кассета экспрессии может быть включена в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, пластидную ДНК, вирус или фрагмент нуклеиновой кислоты. Как правило, часть рекомбинантной кассеты экспрессии вектора экспрессии включает среди прочих последовательно-

стей транскрибируемую нуклеиновую кислоту и промотор.

Термины "остаток", или "аминокислотный остаток", или "аминокислота" попеременно используются в настоящем описании для обозначения аминокислоты, которая включается в белок, полипептид или пептид (в совокупности "белок"). Аминокислота может быть природной аминокислотой и, если нет иных ограничений, может охватывать искусственные аналоги природных аминокислот, которые могут функционировать аналогично природным аминокислотам.

Термин "селективно гибридизируется" включает ссылку на гибридизацию (при жестких условиях гибридизации) последовательности нуклеиновой кислоты с другой последовательностью нуклеиновой кислоты или другими биологическими молекулами. При использовании системы обнаружения на основе гибридизации выбирают зонд нуклеиновой кислоты, который комплементарен референсной последовательности нуклеиновой кислоты, и затем при подборе подходящих условий зонд и референсная последовательность селективно гибридизируются, или связываются, друг с другом, образуя двухцепочечную молекулу.

Термин "жесткие условия" или "жесткие условия гибридизации" включает ссылку на условия, при которых зонд гибридизируется со своей целевой последовательностью в обнаружимо большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза по сравнению с фоном). Жесткие условия зависят от последовательности и будут различными в различных обстоятельствах. Регуляция жесткости условий гибридизации и/или промывки позволяет идентифицировать целевые последовательности, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование).

В альтернативе условия жесткости можно регулировать, чтобы допустить некоторое несоответствие последовательностей для обнаружения более низких степеней подобия (гетерологичное зондирование). Как правило, зонд имеет длину меньше чем приблизительно 1000 нуклеотидов, необязательно меньше чем 500 нуклеотидов.

Как правило, жесткие условия будут такими условиями, при которых концентрация соли составляет меньше чем приблизительно 1,5 М иона Na, обычно с концентрацией приблизительно 0,01-1,0 М иона Na (или других солей), при pH 7,0-8,3 и температуре по меньшей мере приблизительно 30°C в случае коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C в случае длинных зондов (например, больше 50 нуклеотидов). Жесткие условия могут быть также достигнуты при добавлении дестабилизирующих веществ, таких как формамид. Специфичность обычно является функцией промывки после гибридизации, при этом важными факторами является ионная сила и температура готового промывочного раствора. В случае ДНК/ДНК гибридов температура плавления (Тп) может быть приближенно вычислена из уравнения Майнкота и Валя (Meinkoth and Wahl, *Anal. Biochem.*, 138: 267-284 (1984))

$$T_p [^{\circ}C] = 81,5 + 16,6(\log M) + 0,41(\%GC) - 0,61(\%форм) - 500/L,$$

где M является молярной концентрацией моновалентных катионов,
%GC является процентом нуклеотидов гуанинозина и цитозина в ДНК,
%форм является процентом формамида в гибридизационном растворе, и
L является длиной гибрида в парах оснований.

Тп является температурой (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной целевой последовательности гибридизируется с идеально совпадающим зондом. Тп снижается приблизительно на 1°C при каждом 1% несоответствия. Таким образом, Тп, условия гибридизации и/или промывки можно регулировать для гибридизации с последовательностями требуемой идентичности. Например, при поиске последовательностей с >90% идентичностью Тп можно понизить на 10°C. Как правило, жесткие условия выбирают так, чтобы температура была приблизительно на 5°C ниже, чем Тп для определенной последовательности и ее комплемента при определенной ионной силе и pH. Впрочем, в случае наиболее жестких условий можно использовать гибридизацию и/или промывку при температуре на 1-4°C ниже Тп. В случае умеренно жестких условий можно использовать гибридизацию и/или промывку при температуре на 6-10°C ниже Тп. В случае условий низкой жесткости можно использовать гибридизацию и/или промывку при температуре на 11-20°C ниже Тп. При использовании уравнения, составов для гибридизации и промывки и требуемой Тп средним специалистам будет очевидно, что изменения жесткости гибридизации и/или промывочные растворы описаны по определению. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в

Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays"*, Elsevier, New York (1993); и в *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2*, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995).

При использовании в настоящем описании "трансгенное животное, клетка или ткань" включают ссылку на животное, которое содержит в своем геноме гетерологичный полинуклеотид. Как правило, гетерологичный полинуклеотид стабильно интегрируется в геном таким образом, чтобы полинуклеотид передавался последующим поколениям. Гетерологичный полинуклеотид может быть интегрирован в геном отдельно или как часть рекомбинантной кассеты экспрессии. "Трансгенный" при использовании в настоящем описании включает любую клетку, линию клеток, ткань или орган, генотип которых был изменен в результате присутствия гетерологичной нуклеиновой кислоты, включающей трансгенные объекты, первоначально измененные таким образом, а также созданные при половом скрещивании или бесполом размножении исходного трансгенного объекта. Термин "трансгенный" при использовании в настоящем описании не охватывает изменение генома (хромосомного или внехромосомного) при помощи стандартных методов селекции или в результате природных событий, таких как случайное перекрестное оплодотворение, инфицирование нереккомбинантным вирусом, трансформация нереккомбинантной бактерией, нереккомбинантная транспозиция или спонтанная мутация.

При использовании в настоящем описании "вектор" включает ссылку на нуклеиновую кислоту, используемую в трансфекции клетки-хозяина, в которую может быть вставлен полинуклеотид. Векторы часто являются репликонами. Векторы экспрессии обеспечивают транскрипцию нуклеиновой кислоты, встроенной в них.

Следующие термины используются для описания отношений последовательности между полинуклеотидом/полипептидом настоящего изобретения и референсным полинуклеотидом/полипептидом: (a) "референсная последовательность", (b) "окно сравнения", (c) "идентичность последовательности" и (d) "процент идентичности последовательности".

(a) При использовании в настоящем описании "референсная последовательность" является определенной последовательностью, используемой в качестве основы для сравнения последовательности с полинуклеотидом/полипептидом настоящего изобретения. Референсная последовательность может быть фрагментом или полноразмерной указанной последовательностью; например, как сегмент полноразмерной кДНК или последовательности гена или полная кДНК или последовательность гена.

(b) При использовании в настоящем описании "окно сравнения" включает ссылку на смежный и определенный сегмент последовательности полинуклеотида/полипептида, где последовательность полинуклеотида/полипептида может сравниваться с референсной последовательностью и где часть последовательности полинуклеотида/полипептида в окне сравнения может включать добавления или делеции (т.е. пропуски) по сравнению с референсной последовательностью (которая не включает добавлений или делеций) при оптимальном выравнивании двух указанных последовательностей. Как правило, окно сравнения имеет протяженность по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов/аминокислотных остатков и обязательно может быть 30, 40, 50, 100 или больше. Специалистам в данной области известно, что, для того чтобы избежать высокого подобия референсной последовательности из-за включения пропусков в последовательности полинуклеотида/полипептида, обычно вводят штраф за пропуски, который вычитают из количества совпадений.

Методы выравнивания последовательностей для сравнения известны в уровне техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено с применением алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482(1981)); алгоритма выравнивания гомологии Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970); метода поиска подобия Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2444 (1988)); и с помощью компьютерной реализации этих алгоритмов, в том числе, без ограничения: CLUSTAL в программе PC/Gene (Intelligenetics, Mountain View, California); GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA и подобных программ в пакете программ GCG Wisconsin Genetics, Version 10 (доступном от Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USA). Программа CLUSTAL хорошо описана в Higgins and Sharp, *Gene* 73: 237-244 (1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5: 151-153 (1989); Corpet, et al., *Nucleic Acids Research* 16: 10881-90 (1988); Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences* 8: 155-65 (1992), а также в Pearson, et al., *Methods in Molecular Biology* 24: 307-331 (1994).

Семейство программ BLAST, которые могут использоваться для поиска подобия в базах данных, включает: BLASTN для поиска нуклеотидных последовательностей в базах нуклеотидных последовательностей; BLASTX для поиска нуклеотидных последовательностей в базах белковых последовательностей; BLASTP для поиска белковых последовательностей в базах белковых последовательностей; TBLASTN для поиска белковых последовательностей в базах нуклеотидных последовательностей; и TBLASTX для поиска нуклеотидных последовательностей в базах нуклеотидных последовательностей. См., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995); Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990); и Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997). Программы для выполнения анализов BLAST общедоступны, например, на сервере Национального центра биотехнологической информации США (ncbi.nlm.nih.gov/). Данный алгоритм был подробно описан во многих публикациях. См., например, Altschul SF et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*, 25 *NUCLEIC ACIDS RES.* 3389 (1997); National Center for Biotechnology Information, THE NCBI HANDBOOK [INTERNET], Chapter 16:

The BLAST Sequence Analysis Tool (McEntyre J, Ostell J, eds., 2002), доступен по ссылке <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/pdf/ch16.pdf>. Программа BLASTP для аминокислотных последовательностей была также подробно описана (см. Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

В дополнение к вычислению процента идентичности последовательностей алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ подобию между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993)). Ряд программ-фильтров низкой сложности могут использоваться для уменьшения таких выравниваний низкой сложности. Например, фильтры низкой сложности SEG (Wooten and Federhen, Comput. Chem., 17: 149-163 (1993)) и XNU (Claverie and States, Comput. Chem., 17: 191-201 (1993)) могут использоваться по отдельности или в комбинации.

Если не указано иное, значения идентичности/подобия нуклеотидов и белков, приведенные в настоящем описании, вычислены с помощью GAP (GCG версии 10) при использовании значений по умолчанию. GAP (Global Alignment Program) может также использоваться для сравнения полинуклеотида или полипептида настоящего изобретения с референсной последовательностью. В GAP используется алгоритм Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970)) для поиска выравнивания двух полных последовательностей с максимальным числом совпадений и минимальным количеством пропусков. GAP представляет одного из членов семейства методов наилучшего выравнивания. Это семейство может включать множество членов, но ни один другой не обладает лучшим качеством. GAP предоставляет четыре критерия качества выравнивания: качество, отношение, идентичность и подобие. Качество является критерием, максимально повышаемым для выравнивания последовательностей. Отношение является качеством, деленным на количество оснований в более коротком сегменте. Процент идентичности является процентом символов, которые фактически совпадают. Процент подобия является процентом символов, которые являются подобными. Символы, которые расположены напротив пропусков, исключаются. Подобие оценивают, когда значение матрицы замен для пары символов больше или равно 0,50, порогу подобия. Матрицей замен, используемой в пакете программ Wisconsin Genetics версии 10, является BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915).

Множественное выравнивание последовательностей может быть выполнено при использовании метода выравнивания CLUSTAL (Higgins and Sharp (1989) CABIOS. 5: 151-153) с параметрами по умолчанию (GAPPENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10). Параметры по умолчанию для парных выравниваний с использованием метода CLUSTAL включают KTUPLE 1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 и DIAGONALS SAVED=5.

(с) При использовании в настоящем описании "идентичность последовательностей" или "идентичность" в отношении двух последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов включают ссылку на остатки в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании с максимальным соответствием в определенном окне сравнения. При использовании процента идентичности последовательностей в отношении белков известно, что положения остатков, которые не являются идентичными, часто отличаются консервативными аминокислотными заменами, когда аминокислотные остатки заменены другими аминокислотными остатками с подобными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность), и поэтому не изменяют функциональные свойства молекулы. В случаях когда последовательности отличаются консервативными заменами, процент идентичности последовательностей может быть увеличен для поправки на консервативную природу замены. Последовательности, которые отличаются такими консервативными заменами, как говорят, обладают "подобием последовательности" или "подобием". Способы введения такой поправки известны специалистам. Обычно это включает оценку консервативной замены как частичное, а не полное несоответствие с увеличением в результате процента идентичности последовательностей. Таким образом, например, когда идентичной аминокислоте присваивают оценку 1, а неконсервативной замене присваивают оценку 0, консервативной замене присваивают оценку от 0 до 1. Оценка консервативных замен может быть вычислена согласно алгоритму Мейерса и Миллера (Meyers and Miller, Computer Applic. Biol. Sci., 4: 11-17 (1988)), например, как реализовано в программе PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, USA).

(d) При использовании в настоящем описании "процент идентичности последовательностей" означает значение, определенное при сравнении двух оптимально выровненных последовательности в окне сравнения, где часть последовательности полинуклеотида в окне сравнения может включать добавления или делеции (т.е. пропуски) по сравнению с референсной последовательностью (которая не включает добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух указанных последовательностей. Процент вычисляют, определяя количество положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток присутствуют в обеих последовательностях, с получением количества совпавших положений, деля количество совпавших положений на общее количество положений в окне сравнения и умножая результат на 100 с получением процента идентичности последовательностей.

При использовании в настоящем описании "редактирование гена", "редактированный ген", "генетически редактированный" и "редактирующий ген эфффекторы" относятся к применению природных или искусственно сконструированных нуклеаз, также называемых "молекулярными ножницами". Нуклеазы создают определенный двухцепочечный разрыв (DSB) в нужных положениях в геноме, при этом в неко-

торых случаях используются эндогенные механизмы клетки для репарации созданного разрыва посредством природных процессов гомологичной рекомбинации (HR) и/или негомологичного соединения концов (NHEJ). Средства редактирования генов включают цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), подобные активаторам транскрипции эффекторные нуклеазы (TALEN), систему кластерных, разделенных регулярными интервалами, коротких палиндромных повторов/CAS9 (CRISPR/Cas9) и мегануклеазу, реконструированную как хоминг-эндонуклеазы. Указанные термины также включают применение трансгенных процедур и методик, включая, например, случаи, когда изменение является относительно малым и/или не производится введение ДНК из чужеродного биологического вида. Термины "генетическая манипуляция" и "подвергнутый генетической манипуляции" включают методики редактирования генов, которые также и/или в дополнение к другим методикам и процессам изменяют или модифицируют нуклеотидную последовательность гена или ген или изменяют или модифицируют экспрессию гена или генов.

При использовании в настоящем описании "технология хоминга ДНК" или "хоминг технология" охватывают любые механизмы, которые позволяют определенной молекуле направленно воздействовать на определенную последовательность ДНК, включающую цинк-пальцевые (ZF) белки, подобные активаторам транскрипции эффекторные (TALE) мегануклеазы и систему CRISPR/Cas9.

Термин "сельскохозяйственное животное" включает животных, традиционно выращиваемых в животноводческом хозяйстве, таких как мясной скот, молочный скот, свиньи, овцы, козы, лошади, мулы, ослы, буйволы и верблюды. Термин также включает птиц, выращиваемых промышленно ради мяса или яиц (т.е. кур, индеек, уток, гусей, цесарок и сквобов). Данный термин не включает крыс, мышей или других грызунов.

При использовании в настоящем описании "бластоциста" означает раннюю стадию развития эмбриона, состоящего из внутренней клеточной массы (из которой нормально развивается эмбрион) и наполненной жидкостью полости, обычно окруженной одним слоем трофобластных клеток. "Developmental Biology", sixth edition, ed. by Scott F. Gilbert, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Mass. (2000).

При использовании в настоящем описании "условный нокаут" или "условная мутация" означают, что нокаут или мутация достигаются при соблюдении некоторых условий. Эти условия включают, без ограничения, наличие некоторых индуцирующих средств, рекомбиназ, антибиотиков и некоторых уровней температуры или солей.

Термин "эмбрион ранней стадии" означает любой эмбрион на эмбриональных стадиях от оплодотворенной яйцеклетки до бластоцисты. Как правило, эмбрионами ранней стадии называют эмбрионы восьмиклеточной стадии и стадии морулы.

"Эмбриональные половые клетки" или "ЭП клетки" означают клетки, происходящие из первичных половых клеток, которые способны дифференцироваться во все типы клеток тела и так же поддаются генетической модификации, как и эмбриональные стволовые клетки, причем до такой степени, что иногда различие между ЭП клетками и ЭС клетками игнорируется. "Developmental Biology", sixth edition, ed. by Scott F. Gilbert, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Mass. (2000).

"Эмбриональные стволовые клетки" или "ЭС клетки" означают культивируемые клетки, происходящие из внутренней клеточной массы эмбриона ранней стадии, которые поддаются генетической модификации и которые сохраняют свою тотипотентность, а также могут включаться во все органы получаемого химерного животного при введении в эмбрион-хозяин. "Developmental Biology", sixth edition, ed. by Scott F. Gilbert, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Mass. (2000).

При использовании в настоящем описании "оплодотворение" означает объединение мужских и женских гамет в процессе репродукции, приводящее к формированию зиготы - самой ранней стадии развития эмбриона. "Чужеродная клетка" означает любую клетку, которая может быть подвергнута генетическому редактированию или может быть получена из генетически отредактированной клетки и которая может развиваться в зародышевую линию химерного эмбриона при введении или слиянии с донорской бластоцистой/эмбрионом. Это включает, без ограничения, эмбриональные стволовые (ЭС) клетки, стволовые клетки тератокарциномы, первичные половые клетки и эмбриональные половые (ЭП) клетки.

Фраза "генетически отредактированный" означает такие животные, или эмбрионы, или клетки, которые имеют нужную генетическую модификацию, такую как нокаут, нокин, условную, индуцируемую, транзистентную или точечную мутацию(и) любого гена, или его регуляторного механизма, трансгенного с чужеродным или модифицированным геном(ми), или регуляторных последовательностей, подвергшихся геномной модификации любым способом, включающим, без ограничения, рекомбинацию, хромосомную делецию, добавление, транслокацию, перестройку или добавление, делецию или модификацию нуклеиновой кислоты, белка или любой другой природной или синтетической молекулы или органеллы, или цитоплазматический или ядерный перенос, приводящие к наследственным изменениям.

"Развитие половой клетки" означает процесс, в ходе которого некоторые клетки в эмбрионе на ранней стадии развития дифференцируются в первичные половые клетки.

"Миграция половых клеток" означает процесс, в ходе которого первичные половые клетки после зарождения во внезародышевой мезодерме возвращаются в эмбрионе через аллантаис (предшественник пулочного канатика) и продолжают мигрировать через прилегающий желточный мешок, заднюю кишку и дорсальную брыжейку, достигая в результате полового тяжа (развивающейся гонады). "Developmental

Biology", sixth edition, ed. by Scott F. Gilbert, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Mass. (2000).

"Клетка зародышевой линии" означает любую клетку на любой стадии дифференцировки в зрелые гаметы, включая зрелые гаметы.

При использовании в настоящем описании термин "нокин" означает замену эндогенного гена трансгеном или таким же эндогенным геном с некоторой структурной модификацией(ями), но с сохранением транскрипционного контроля над эндогенным геном.

"Нокаут" означает нарушение структуры или регуляторного механизма гена. Нокауты могут быть сделаны посредством гомологичной рекомбинации направляющих векторов, векторов замены, векторов hit-and-run ("ударил-убежал") или случайной вставки вектора генной ловушки, приводящих к полной, частичной или условной потере функции гена. "Оогенез" означает процесс образования зрелых яйцеклеток из первичных половых клеток у особей женского пола.

"Первичные половые клетки" означают такие клетки, появляющиеся на ранней стадии эмбрионального развития, из которых образуется сперматогенная клеточная линия через промежуточные гоноциты или женская зародышевая линия через промежуточные оогонии.

"Сперматогенез" означает процесс образования зрелых сперматозоидов из сперматогонияльных стволовых клеток у особей мужского пола.

"Дикий тип" означает таких животных и бластоцист, эмбрионов или клеток, полученных из них, которые не были подвергнуты генетическому редактированию и обычно являются нативными и аутбредными линиями, полученными из природных линий.

"Связывающий белок" является белком, который способен связываться с другой молекулой. Связывающий белок может связываться, например, с молекулой ДНК (ДНК-связывающий белок), молекулой РНК (РНК-связывающий белок) и/или молекулой белка (белок-связывающий белок). В случае белок-связывающего белка он может связываться сам с собой (с образованием гомодимеров, гомотримеров и т.д.) и/или он может связываться с одной или более молекулами другого белка или белков. Связывающий белок может обладать более чем одним типом связывающей активности. Например, цинк-пальцевые белки обладают ДНК-связывающей, РНК-связывающей и белок-связывающей активностью.

"Цинк-пальцевый ДНК-связывающий белок" (или связывающий домен) является белком, или доменом в более крупном белке, который сиквенс-специфически связывает ДНК с помощью одного или более цинковых пальцев, которые являются областями аминокислотной последовательности в связывающем домене, структура которого стабилизируется при образовании координационных связей с ионом цинка. Термин цинк-пальцевый ДНК-связывающий белок часто сокращенно называют цинк-пальцевым белком или ZFP.

"ДНК-связывающий домен TALE" или "TALE" является полипептидом, включающим один или более повторяющихся TALE доменов/звеньев. Повторяющиеся домены участвуют в связывании TALE со своей распознаваемой целевой последовательностью ДНК. Одно "повторяющееся звено" (также называемое "повтором") обычно имеет длину 33-35 аминокислот и демонстрирует, по меньшей мере, некоторую гомологию последовательности с другими последовательностями TALE повторов в природном белке TALE.

Цинк-пальцевые и TALE связывающие домены могут быть "сконструированы" для связывания с определенной нуклеотидной последовательностью, например, в результате инженерии (изменения одной или более аминокислот) распознающей спиральной области природных цинк-пальцевых или TALE белков. Таким образом, сконструированные ДНК-связывающие белки (цинковые пальцы или TALE) являются белками, которые не встречаются в природе. Неограничивающими примерами способов инженерии ДНК-связывающих белков являются конструирование и отбор. Сконструированный ДНК-связывающий белок является белком, не встречающимся в природе, конструкция/состав которого является преимущественно результатом рациональных критериев. Рациональные критерии конструирования включают применение правил замены и компьютерных алгоритмов для обработки информации в базе данных, в которой содержится информация о существующих структурах ZFP и/или TALE и данных связывания. См., например, патенты США 6140081, 6453242 и 6534261; см. также WO 98/53058, WO 98/53059, WO 98/53060, WO 02/016536, WO 03/016496 и патентную публикацию США 20110301073.

"Отобранный" цинк-пальцевый белок или TALE является белком, не существующим в природе, получение которого является прежде всего результатом эмпирического процесса, такого как фаговый дисплей, ловушка взаимодействия или гибридный отбор. См., например, патент США 5789538, патент США 5925523, патент США 6007988, патент США 6013453, патент США 6200759, WO 95/19431, WO 96/06166, WO 98/53057, WO 98/54311, WO 00/27878, WO 01/60970, WO 01/88197, WO 02/099084 и патентную публикацию США 20110301073.

"Расщепление" относится к разрыву ковалентной цепи молекулы ДНК. Расщепление может быть инициировано множеством методов, включающих, без ограничения, ферментативный или химический гидролиз фосфодиэфирной связи. Возможно как одноцепочечное расщепление, так и двухцепочечное расщепление, причем двухцепочечное расщепление может происходить в результате двух отдельных событий расщепления одиночной цепи. Расщепление ДНК может приводить к образованию тупых концов или ступенчатых концов. В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды используются

для направленного расщепления двойной цепи ДНК.

"Расщепляющий полудомен" является полипептидной последовательностью, которая в сочетании со вторым полипептидом (идентичным или другим) образует комплекс, обладающий расщепляющей активностью (предпочтительно расщепляющей активностью в отношении двойной цепи). Термины "первый и второй расщепляющие полудомены"; "+ и - расщепляющие полудомены" и "правый и левый расщепляющие полудомены" используются попеременно для обозначения пар расщепляющих полудоменов, которые димеризуются.

"Сконструированный расщепляющий полудомен" является расщепляющим полудоменом, который был модифицирован таким образом, что он образует облигатные гетеродимеры с другим расщепляющим полудоменом (например, другим сконструированным расщепляющим полудоменом). См. также патентные публикации США 2005/0064474, 2007/0218528, 2008/0131962 и 2011/0201055, полностью включенные в настоящую заявку посредством отсылки.

Средства для создания двухцепочечного разрыва ДНК следующие. При использовании в настоящем описании термин "средства для создания двухцепочечного разрыва ДНК" ссылается на особые положения требования, утвержденные Конгрессом США в п.35 Свода законов США, разд.112, шестой параграф. В частности, "средство для создания двухцепочечного разрыва ДНК" относится к молекулярной структуре, которая способна расщеплять обе цепи двухцепочечной молекулы ДНК. Такие структуры включают домены полипептидов, содержащиеся во многих известных белках нуклеаз, например домен нуклеазы FokI, каталитический домен выбран из группы, состоящей из белков Mmel, колицин-Е7 (CEA7 ECOLX), КОЛИЦИН-Е9, APFL, EndA, Endo I (END1_ECOLI), Endo G человека (NUCG_HUMAN), Endo G коровы (NUCG_BOVIN), R.HinP11, 1-Bas-1, 1-Bmo-1, 1-Hmul, 1-Tev-1, 1-Tev11, 1-Tev111, 1-Two1, R.Msp1, R.Mva1, NucA, NucM, Vvn, Vvn CLS, стафилококковой нуклеазы (NUC_STAAU), стафилококковой нуклеазы (NUC_STAHY), микрококковой нуклеазы (NUC_SHIFL), эндонуклеазы uncB, эндодезоксирибонуклеазы I (ENRN_BPT7), метназы, Nb.BsrDI, BsrDI A, Nt.BspD61 (R.BspD61 большая субъединица), ss.BspD61 (R.BspD61 малая субъединица), R.PleI, Mly1, Alw1, Mva12691, Bsr1, Bsm1, Nb.BtsCI, Nt.BtsCI, Rl.Bts1, R2.Bts1, BbvCI субъединицы 1, BbvCI субъединицы 2, Bpu101 альфа-субъединицы, Bpu101 бета-субъединицы, Bmr1, Bfi1, 1-Cre1, hExo1 (EX01_HUMAN), Yeast Exo1 (EX01_YEAST), E. coli Exo1, TREX2 человека, TREX1 мыши, TREX1 человека, TREX1 коровы, TREX1 крысы, DNA2 человека, DNA2 дрожжей (DNA2 YEAST).

Средства для репарации двухцепочечного разрыва ДНК следующие. При использовании в настоящем описании термин "средства для репарации двухцепочечного разрыва ДНК" также ссылается на особые положения требования, утвержденные Конгрессом США в п.35 Свода законов США, разд.112, шестой параграф. В частности, "средство для репарации двухцепочечного разрыва ДНК" относится к молекулярной структуре, которая способна облегчать/катализировать соединение концов двухцепочечных молекул ДНК, например, посредством соединения концов, полученных при расщеплении одной двухцепочечной молекулы ДНК, или соединения одного конца, полученного при расщеплении одной двухцепочечной молекулы ДНК, с концом экзогенной двухцепочечной молекулы ДНК. Такие структуры включают полипептидные домены, содержащиеся во многих известных белках лигазах, например Cre рекомбиназе. В некоторых примерах такая же молекулярная структура может одновременно служить в качестве средства для создания двухцепочечного разрыва ДНК и средства для репарации двухцепочечного разрыва ДНК, где одна и та же структура облегчает и расщепление, и репарацию двухцепочечных молекул ДНК (например, Hin рекомбиназа).

Создание сайт-специфических двухцепочечных разрывов в геноме индуцирует путь репарации ДНК клетки-хозяина, который восстанавливает двухцепочечный разрыв посредством направляемой гомологией репарации (HDR) или репарации с негомологичным соединением концов (NHEJ). На донорной молекуле может присутствовать один или более сайтов расщепления ZFN (один сайт расщепления ZFN служит для линейаризации всей донорной молекулы, 2 таких же сайта ZFN служат для отщепления малого донорного фрагмента ДНК или 2 различных сайта ZFN служат для отщепления фрагмента из донора и соответствующего фрагмента из геномной ДНК хозяина (замещение ДНК)).

Таким образом, донорный полинуклеотид может быть ДНК или РНК, одноцепочечной и/или двухцепочечной, и может быть введен в клетку в линейной или кольцевой форме. См., например, патентные публикации США 2010/0047805 и 2011/0207221. В некоторых случаях варианты осуществления настоящего изобретения могут также включать линейную экзогенную (донорную) нуклеиновую кислоту(ы), композиции, включающие эти нуклеиновые кислоты, и способы получения и применения таких линейных донорных молекул. В некоторых вариантах осуществления линейная донорная молекула стабильно сохраняется в клетке, в которую она введена. В других вариантах осуществления линейная донорная молекула модифицирована для устойчивости к экзонуклеолитическому расщеплению, например, путем введения одной или более фосфоротиоатных фосфодиэфирных связей между одной или более парами оснований на концах донорной молекулы. Линейная экзогенная нуклеиновая кислота может также включать определенную одноцепочечную ДНК.

Редактирование гена NANOS.

NANOS представляет собой эволюционно консервативное семейство РНК-связывающих белков,

которые специфически экспрессируются в половых клетках беспозвоночных и позвоночных животных. Удаление NANOS и его ортологов приводит к потере половых клеток у дрозофилы, *C.elegans*, данио-рерио, *Xenopus* и мыши. У людей потеря половых клеток и бесплодие связаны с мутациями в генах NANOS.

У позвоночных были идентифицированы три гена NANOS, из которых NANOS2 и NANOS3 экспрессируются в ППК. У мышей белок NANOS3 сначала обнаруживается в ранних ППК, сохраняется в процессе их миграции в половой тяж, а затем пропадает в день 15.5 развития эмбриона у самцов или до E13.5 у эмбрионов самок. В отличие от этого, экспрессия NANOS2 ограничена мужской гонадой. мРНК NANOS2 сначала обнаруживается в половых клетках, которые колонизируют гонаду эмбрионов самцов около E13.0, после того как половые клетки начинают взаимодействовать с гонадными соматическими клетками. Хотя экспрессия транзитно уменьшается на более поздних стадиях эмбриогенеза, мРНК NANOS2 снова обнаруживается в гоноцитах во время неонатального развития.

Удаление NANOS3 у мышей приводит к полной потере половых клеток у обоих полов в результате апоптотической гибели клеток около E8.0. Важно то, что инактивация NANOS2 у мышей приводит к потере половых клеток у эмбрионов мужского пола только около E15.5. Таким образом, зародышевая линия на момент рождения полностью лишена самцов мышей, но при этом популяции тестикулярных соматических поддерживающих клеток функционально интактны. Кроме того, не имеющие NANOS2 самцы и самки жизнеспособны и растут до нормальной зрелости. Кроме того, не имеющие NANOS2 самки имеют нормальную фертильность. Настоящие заявители продемонстрировали, что NANOS2 специфически экспрессируется ППК в эмбрионах свиньи.

Семейство генов NANOS известно, а последовательности, кодирующие их, доступны в Genbank или других подобных источниках. Последовательности нуклеиновой кислоты и белка NANOS1 кабана (*Sus scrofa*) раскрыты в XM_01928298 и в настоящей заявке как SEQ ID NO: 5 и 6. NANOS2 представлен в XM_003127232.1 или в настоящей заявке как SEQ ID NO: 1 и 2, и NANOS3 - в XM_005661246 или SEQ ID NO: 3 и 4, гены NANOS коровы доступны в NM_001291904 и SEQ ID NO: 9 и 10 (NANOS2); XM_005225796 SEQ ID NO: 11 и 12 (NANOS1); XM_001787922 SEQ ID NO: 13 и 14 (NANOS1 alt).

В настоящем описании представлены генетически отредактированные животное или клетка животного, включающие по меньшей мере одну отредактированную хромосомную последовательность, кодирующую белок NANOS или другой белок, связанный с функцией или развитием половых клеток. Редактированная хромосомная последовательность может быть (1) инактивирована, (2) модифицирована или может (3) включать интегрированную последовательность. Инактивированная хромосомная последовательность изменена таким образом, чтобы функция белка NANOS в отношении развития сперматогонимальных клеток была нарушена, уменьшена или устранена. Таким образом, генетически отредактированное животное, включающее инактивированную хромосомную последовательность, можно назвать "нокаутом" или "условным нокаутом." Аналогичным образом генетически отредактированное животное, включающее интегрированную последовательность, можно назвать "нокином" или "условным нокином". Кроме того, генетически отредактированное животное, включающее модифицированную хромосомную последовательность, может включать направленную точечную мутацию(и) или другую модификацию, в результате которой образуется измененный белковый продукт. Кратко, способ включает введение в эмбрион или клетку по меньшей мере одной молекулы РНК, кодирующей направленную цинк-пальцевую нуклеазу и необязательно по меньшей мере один вспомогательный полинуклеотид. Способ дополнительно включает инкубирование эмбриона или клетки для обеспечения экспрессии цинк-пальцевой нуклеазы, где репарация двухцепочечного разрыва, введенного в хромосомную последовательность-мишень цинк-пальцевой нуклеазой, осуществляется посредством процесса склонной к ошибкам репарации ДНК с негомологичным соединением концов или процессом направляемой гомологией репарации ДНК.

Способ редактирования хромосомных последовательностей, кодирующих белок, связанный с развитием зародышевой линии, с применением технологии направленных цинк-пальцевых нуклеаз является быстрым, точным и очень эффективным.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один локус NANOS (например, локус NANOS2) используется в качестве сайта-мишени для сайт-специфического редактирования. Это может включать вставку экзогенной нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес полипептид) или делеции нуклеиновых кислот из локуса. В конкретных вариантах осуществления вставки и/или делеции модифицируют локус. Например, интеграция экзогенной нуклеиновой кислоты и/или делеция части геномной нуклеиновой кислоты могут модифицировать локус с получением прерванного (т.е. инактивированного) гена NANOS.

В некоторых вариантах осуществления отредактированный локус NANOS может включать нуклеотидную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 152, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 202, 203 или 204. В некоторых вариан-

тах осуществления редактируемый локус NANOS может включать нуклеотидную последовательность, которая по существу идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 152, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 202, 203 или 204. Например, в некоторых вариантах осуществления локус NANOS является гомологом NANOS (например, ортологом или паралогом), который включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 85% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 152, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 202, 203 или 204. Гомолог NANOS может включать нуклеотидную последовательность, т.е., например, без ограничения, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 91%, по меньшей мере на приблизительно 92%, по меньшей мере на приблизительно 93%, по меньшей мере на приблизительно 94%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% и/или по меньшей мере на приблизительно 99,9% идентичную нуклеотидной последовательности из приблизительно 20 смежных нуклеотидов, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 152, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 202, 203 или 204.

Направленная интеграция нуклеиновой кислоты в локус NANOS.

Сайт-специфическая интеграция экзогенной нуклеиновой кислоты в локус NANOS может быть выполнена с помощью любой методики, известной специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления интеграция экзогенной нуклеиновой кислоты в локус NANOS включает контакт клетки (например, выделенной клетки или клетки в ткани или организме) с молекулой нуклеиновой кислоты, включающей экзогенную нуклеиновую кислоту. Например, такая молекула нуклеиновой кислоты может включать нуклеотидные последовательности, фланкирующие экзогенную нуклеиновую кислоту, которые облегчают гомологичную рекомбинацию между молекулой нуклеиновой кислоты и по меньшей мере одним локусом NANOS. В конкретных примерах нуклеотидные последовательности, фланкирующие экзогенную нуклеиновую кислоту, которые облегчают гомологичную рекомбинацию, могут быть комплементарны эндогенным нуклеотидам локуса NANOS. В конкретных примерах нуклеотидные последовательности, фланкирующие экзогенную нуклеиновую кислоту, которые облегчают гомологичную рекомбинацию, могут быть комплементарны ранее интегрированным экзогенным нуклеотидам. В некоторых вариантах осуществления множество экзогенных нуклеиновых кислот может быть интегрировано в одном локусе NANOS, как в случае стэкинга генов.

Интеграция нуклеиновой кислоты в локус NANOS может способствовать (например, катализировать) в некоторых вариантах осуществления эндогенный клеточный аппарат клетки-хозяина, например, без ограничения, эндогенная ДНК и эндогенные ферменты рекомбиназы. В некоторых вариантах осуществления интеграция нуклеиновой кислоты в локус NANOS могут способствовать один или более факторов (например, полипептиды), которые введены в клетку-хозяин. Например, полипептиды нуклеаза(ы), рекомбиназа(ы) и/или лигаза могут быть введены (независимо или как часть химерного полипептида) при контакте полипептидов с клеткой-хозяином или при экспрессии полипептидов в клетке-хозяине. Соответственно в некоторых примерах нуклеиновая кислота, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один полипептид нуклеазу, рекомбиназу и/или лигазу, может быть введена в клетку-хозяин одновременно или последовательно с нуклеиновой кислотой, сайт-специфически интегрируемой в локус NANOS, где по меньшей мере один полипептид нуклеаза, рекомбиназа и/или лигаза экспрессируется с нуклеотидной последовательностью в клетке-хозяине.

ДНК-связывающие полипептиды.

В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическая интеграция может быть осуществлена при использовании факторов, которые способны распознавать и связываться с определенными нуклеотидными последовательностями, например, в геноме организма-хозяина. Например, многие белки включают полипептидные домены, которые способны распознавать и связываться с ДНК сайт-специфически. Последовательность ДНК, которую распознает ДНК-связывающий полипептид, может называться последовательностью "мишенью". Полипептидные домены, которые способны распознавать и связываться с ДНК сайт-специфически, обычно имеют правильную укладку и функционируют независимо, сайт-специфически связывая ДНК, даже в случае экспрессии в полипептиде, отличном от белка, из которого

первоначально был выделен такой домен. Аналогичным образом последовательности-мишени, распознаваемые и связываемые ДНК-связывающими полипептидами, обычно могут распознаваться и связываться такими полипептидами даже в том случае, когда они присутствуют в крупных структурах ДНК (например, в хромосоме), в особенности когда участок, в котором расположена последовательность-мишень, является одним из участков, которые, как известно, являются доступными для растворимых клеточных белков (например, ген).

Хотя ДНК-связывающие полипептиды, идентифицированные из белков, которые существуют в природе, обычно связываются с отдельной нуклеотидной последовательностью или мотивом (например, консенсусной распознаваемой последовательностью), существуют и известны в уровне техники способы модификации многих таких ДНК-связывающих полипептидов, в результате которой они распознают другую нуклеотидную последовательность или мотив. ДНК-связывающие полипептиды включают, например, без ограничения, цинк-пальцевые ДНК-связывающие домены, лейциновые молнии, URA ДНК-связывающие домены, GAL4, TAL, LexA, Tet-репрессор, LacR и рецептор стероидных гормонов.

В некоторых примерах ДНК-связывающий полипептид является цинковым пальцем. Можно сконструировать отдельные цинк-пальцевые мотивы, направленные и специфично связывающиеся с любым из целого ряда участков ДНК. Канонические Cys_2His_2 (а также неканонические Cys_3His) цинк-пальцевые полипептиды связывают ДНК при введении альфа-спирали в большую бороздку двойной спирали ДНК-мишени. Распознавание ДНК цинковым пальцем является модульным. Каждый палец входит в контакт прежде всего с тремя последовательными парами оснований в мишени, при этом распознавание опосредуют несколько ключевых остатков в полипептиде. При включении множества цинк-пальцевых ДНК-связывающих доменов в направляющую эндонуклеазу специфичность связывания ДНК направляющей эндонуклеазы может быть дополнительно увеличена (и, следовательно, специфичность любых регулирующих генов эффектов, сообщаемая таким образом, также может быть увеличена). См., например, Urnov et al. (2005) *Nature* 435:646-51. Таким образом, один или более цинк-пальцевых ДНК-связывающих полипептидов могут быть сконструированы и использованы таким образом, чтобы направляющая эндонуклеаза, введенная в клетку-хозяин, взаимодействовала с последовательностью ДНК, уникальной в геноме клетки-хозяина.

Предпочтительно цинк-пальцевый белок является искусственным в том отношении, что он сконструирован для связывания с выбранным сайтом-мишенью. См., например, Beerli et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo et al. (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan et al. (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo et al. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; U.S. Pat. Nos. 6453242, 6534261, 6599692, 6503717, 6689558, 7030215, 6794136, 7067317, 7262054, 7070934, 7361635, 7253273 и патентные публикации США 2005/0064474, 2007/0218528, 2005/0267061, полностью включенные в настоящую заявку посредством отсылки.

Сконструированный цинк-пальцевый связывающий домен может обладать новой специфичностью связывания по сравнению с природным цинк-пальцевым белком. Способы конструирования включают, без ограничения, рациональный дизайн и различные типы отбора. Рациональный дизайн включает, например, использование баз данных, включающих триплетные (или квадруплетные) нуклеотидные последовательности и отдельные аминокислотные последовательности цинковых пальцев, в которых каждая триплетная или квадруплетная нуклеотидная последовательность связана с одной или более аминокислотными последовательностями цинковых пальцев, которые связывают определенную триплетную или квадруплетную последовательность. См., например, находящиеся в совместном владении патенты США 6453242 и 6534261, полностью включенные в настоящую заявку посредством отсылки.

Примеры способов отбора, включающие фаговый дисплей и двухгибридные системы, раскрыты в патентах США 5789538, 5925523, 6007988, 6013453, 6410248, 6140466, 6200759 и 6242568, а также в WO 98/37186, WO 98/53057, WO 00/27878, WO 01/88197 и GB 2338237. Кроме того, повышение специфичности связывания цинк-пальцевых связывающих доменов было описано, например, в находящейся в совместном владении заявке WO 02/077227.

Кроме того, как раскрыто в данном и других источниках, цинк-пальцевые домены и/или мультипальцевые цинк-пальцевые белки могут быть связаны друг с другом при помощи любых подходящих линкерных последовательностей, включающих, например, линкеры длиной 5 или более аминокислот. См. также патенты США 6479626, 6903185 и 7153949 по поводу примеров линкерных последовательностей длиной 6 или более аминокислот. Белки, описанные в настоящей заявке, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинк-пальцевыми белками.

Выбор сайтов-мишеней следующий. ZFP и способы создания и конструирования слитых белков (и кодирующих их полинуклеотидов) известны специалистам в данной области и подробно описаны в патентах США 61400815, 789538, 6453242, 6534261, 5925523, 6007988, 6013453, 6200759, WO 95/19431, WO 96/06166, WO 98/53057, WO 98/54311, WO 00/27878, WO 01/60970, WO 01/88197, WO 02/099084, WO 98/53058, WO 98/53059, WO 98/53060, WO 02/016536 и WO 03/016496.

Кроме того, как раскрыто в данном и других источниках, цинк-пальцевые домены и/или мультипальцевые цинк-пальцевые белки могут быть связаны друг с другом при помощи любых подходящих линкерных последовательностей, включающих, например, линкеры длиной 5 или более аминокислот.

См. также патенты США 6479626, 6903185 и 7153949 по поводу примеров линкерных последовательностей длиной 6 или более аминокислот. Белки, описанные в настоящей заявке, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинк-пальцевыми белками.

В некоторых примерах ДНК-связывающий полипептид является ДНК-связывающим доменом из GAL4. GAL4 является модульным трансактиватором в *Saccharomyces cerevisiae*, но он также функционирует как трансактиватор во многих других организмах. См., например, Sadowski et al. (1988) *Nature* 335:563-4. В этой регуляторной системе экспрессия генов, кодирующих ферменты метаболического пути галактозы в *S. cerevisiae*, строго регулируется доступным источником углерода. Johnston (1987) *Microbiol. Rev.* 51:458-76. Транскрипционный контроль этих метаболических ферментов опосредуется взаимодействием между позитивным регуляторным белком, GAL4 и 17 пн симметричной последовательностью ДНК, с которой специфично связывается GAL4 (UAS или 5'-активирующая последовательность).

Нативный GAL4 состоит из 881 аминокислотного остатка с молекулярной массой 99 кДа. GAL4 включает функционально автономные домены, объединенные активности которых составляют активность GAL4 *in vivo*. Ma and Ptashne (1987) *Cell* 48:847-53; Brent and Ptashne (1985) *Cell* 43(3 Pt 2):729-36. 65 N-концевых аминокислот GAL4 составляют ДНК-связывающий домен GAL4. Keegan et al. (1986) *Science* 231:699-704; Johnston (1987) *Nature* 328:353-5. Сиквенс-специфическое связывание требует присутствия двухвалентного катиона, связанного координационными связями с 6 остатками Cys, присутствующими в ДНК-связывающем домене. Домен, содержащий связанный координационными связями катион, взаимодействует и распознает консервативный триплет CCG на каждом конце 17 пн UAS посредством прямых контактов с большой бороздкой спирали ДНК. Marmorstein et al. (1992) *Nature* 356:408-14. ДНК-связывающая функция белка помещает C-концевые активирующие транскрипцию домены вблизи промотора таким образом, что активирующие домены могут направлять транскрипцию.

Дополнительные ДНК-связывающие полипептиды, которые могут применяться в некоторых вариантах осуществления, включают, например, без ограничения, связывающую последовательность из AVRBS3-индуцируемого гена; консенсусную связывающую последовательность из AVRBS3-индуцируемого гена или синтетическую связывающую последовательность, сконструированную на их основе (например, UPA ДНК-связывающий домен); TAL; LexA (см., например, Brent & Ptashne (1985), выше); LacR (см., например, Labow et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-56; Bairn et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(12):5072-6); рецептор стероидных гормонов (Elliston et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:11517-121); Tet-репрессор (патент США 6271341) и мутантный Tet-репрессор, который связывается с последовательностью tet оператора в присутствии, но не в отсутствие, тетрациклина (Tc); ДНК-связывающий домен NF-κB; и компоненты регуляторной системы, описанной в Wang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(17):8180-4, в которой используется слитый белок GAL4, рецептора гормона и VP16.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен одной или более нуклеаз, применяемых в способах и композициях, описанных в настоящей заявке, включает природный или сконструированный (не встречающийся в природе) ДНК-связывающий домен TAL-эффектора. См., например, патентную публикацию США 20110301073, полностью включенную в настоящую заявку посредством отсылки.

В других вариантах осуществления нуклеаза включает систему CRISPR/Cas. Локус CRISPR (кластерные, разделенные регулярными интервалами, короткие палиндромные повторы), который кодирует РНК компоненты системы, и локус Cas (CRISPR-ассоциированный), который кодирует белки (Jansen et al., 2002. *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575; Makarova et al., 2002. *Nucleic Acids Res.* 30:482-496; Makarova et al., 2006. *Biol. Direct* 1:7; Haft et al., 2005. *PLoS Comput. Biol.* 1:e60), составляют последовательности генов CRISPR/Cas-нуклеазной системы. Локусы CRISPR в микроорганизмах-хозяевах содержат комбинацию генов Cas, а также некодирующие РНК-элементы, способные программировать специфичность CRISPR-опосредованного расщепления нуклеиновых кислот.

CRISPR II типа является одной из наиболее исследованных систем и выполняет направленное расщепление двойной цепи ДНК в четыре последовательных стадии. Сначала две некодирующие РНК, содержащая повторы пре-crPНК и tracrPНК, транскрибируются с локуса CRISPR. Затем tracrPНК гибридизируется с областями повторов пре-crPНК и вызывает процессинг пре-crPНК в зрелые crPНК, содержащие отдельные спейсерные последовательности. На третьей стадии комплекс зрелой crPНК:tracrPНК направляет Cas9 к ДНК-мишени в результате спаривания оснований по Уотсону-Крику между спейсером на crPНК и протоспейсером на ДНК-мишени, расположенным после смежного с протоспейсером мотива (PAM), дополнительного требования для распознавания мишени. Наконец Cas9 вызывает расщепление ДНК-мишени, создавая двухцепочечный разрыв в протоспейсере. Активность системы CRISPR/Cas включает следующие три этапа:

(i) вставку чужеродных последовательностей ДНК в последовательность повторов CRISPR для предотвращения будущих атак в процессе, называемом 'адаптацией',

(ii) экспрессию соответствующих белков, а также экспрессию и процессинг первичных транскриптов, сопровождаемые

(iii) РНК-опосредованной интерференцией с чужеродной нуклеиновой кислотой.

Таким образом, в бактериальной клетке несколько белков Cas связаны с естественной функцией системы CRISPR/Cas и играют роли в таких функциях, как вставка чужеродной ДНК и т.д.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas может быть "функциональным производным" природного белка Cas.

"Функциональное производное" полипептида с нативной последовательностью является соединением, обладающим качественным биологическим свойством, общим с полипептидом с нативной последовательностью. "Функциональные производные" включают, без ограничения, фрагменты нативной последовательности и производные полипептида с нативной последовательностью, а также его фрагменты при условии, что они обладают биологической активностью, общей с соответствующим полипептидом с нативной последовательностью. Биологическая активность, предусмотренная в настоящей заявке, является способностью функционального производного гидролизовать субстрат ДНК с образованием фрагментов. Термин "производное" охватывает варианты аминокислотной последовательности полипептида, ковалентные модификации и слитые белки на их основе. Подходящие производные полипептида Cas или его фрагмента включают, без ограничения, мутанты, слитые белки, ковалентные модификации белка Cas или его фрагмента. Белок Cas, который включает белок Cas или его фрагмент, а также производные белка Cas или их фрагмент, может быть получен из клетки или синтезированы химически или получены с сочетанием этих двух процедур. Клетка может быть клеткой, которая естественно продуцирует белок Cas, или клеткой, которая естественно продуцирует белок Cas и генетически сконструирована с целью продукции эндогенного белка Cas с более высоким уровнем экспрессии или с целью продукции белка Cas с экзогенно введенной нуклеиновой кислоты, которая кодирует Cas, который является таким же или отличается от эндогенного Cas. В некотором случае клетка в естественном состоянии не продуцирует белок Cas и генетически сконструирована с целью продукции белка Cas.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-связывающий полипептид специфично распознает и связывается с целевой нуклеотидной последовательностью, содержащейся в геномной нуклеиновой кислоте организма-хозяина. В некоторых примерах любое количество отдельных образцов целевой нуклеотидной последовательности может быть обнаружено в геноме организма-хозяина. Целевая нуклеотидная последовательность может быть мало распространена в геноме организма-хозяина (например, в геноме может существовать меньше чем приблизительно 10, приблизительно 9, приблизительно 8, приблизительно 7, приблизительно 6, приблизительно 5, приблизительно 4, приблизительно 3, приблизительно 2 или приблизительно 1 копия(и) целевой последовательности). Например, целевая нуклеотидная последовательность может быть расположена в уникальном участке в геноме организма. Целевые нуклеотидные последовательности могут быть, например, без ограничения, рандомизированно распределены по всему геному относительно друг друга, расположены в различных группах сцепления в геноме, расположены в одной группе сцепления, расположены на разных хромосомах, расположены на одной хромосоме, расположены в геноме на участках, которые экспрессируются в аналогичных условиях в организме (например, под контролем одного и того же или по существу функционально идентичных регуляторных факторов), и расположены близко друг к другу в геноме (например, целевые последовательности могут содержаться в нуклеиновых кислотах, интегрированных как конкатемеры в геномных локусах).

Направляющие эндонуклеазы.

В конкретных вариантах осуществления ДНК-связывающий полипептид, который специфично распознает и связывается с целевой нуклеотидной последовательностью, может содержаться в химерном полипептиде, обеспечивая специфичное связывание химерного полипептида с целевой последовательностью. В примерах такой химерный полипептид может включать, например, без ограничения, полипептиды нуклеазу, рекомбиназу и/или лигазу, поскольку такие полипептиды описаны выше. Химерные полипептиды, включающие ДНК-связывающий полипептид и полипептид нуклеазу, рекомбиназу и/или лигазу, могут также включать другие функциональные полипептидные мотивы и/или домены, такие как, например, без ограничения, спейсерная последовательность, расположенная между функциональными полипептидами в химерном белке, лидерный пептид, пептид, который направляет слитый белок в органеллу (например, ядро), полипептиды, которые отщепляются клеточным ферментом, пептидные метки (например, Мус, His и т.д.) и другие аминокислотные последовательности, которые не нарушают функцию химерного полипептида.

Функциональные полипептиды (например, ДНК-связывающие полипептиды и полипептиды нуклеазы) в химерном полипептиде могут быть функционально связаны. В некоторых вариантах осуществления функциональные полипептиды химерного полипептида могут быть функционально связаны своей экспрессией с одного полинуклеотида, кодирующего, по меньшей мере, функциональные полипептиды, лигированные друг с другом в одной рамке считывания, с получением химерного гена, кодирующего химерный белок. В альтернативных вариантах осуществления функциональные полипептиды химерного полипептида могут быть функционально связаны другими способами, например, с помощью перекрестного связывания независимо экспрессируемых полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий полипептид или направляющая РНК, которые специфично распознают и связываются с целевой нуклеотидной последовательностью, могут

содержаться в одном выделенном белке (или его мутанте), где природный выделенный белок или его мутант также включают полипептид нуклеазы (и также могут включать полипептид рекомбиназу и/или лигазу). Примеры таких выделенных белков включают TALEN, рекомбиназы (например, Cre, Hin, Tre и FLP рекомбиназу), РНК-направляемую CRISPR/Cas9 и мегануклеазы.

При использовании в настоящем описании термин "направляющая эндонуклеаза" относится к природным или сконструированным выделенным белкам и их мутантам, которые включают ДНК-связывающий полипептид или направляющую РНК и полипептид нуклеазы, а также к химерным полипептидам, включающим ДНК-связывающий полипептид или направляющую РНК и нуклеазу. Любая направляющая эндонуклеаза, включающая ДНК-связывающий полипептид или направляющую РНК, которые специфично распознают и связываются с целевой нуклеотидной последовательностью, содержащейся в локусе NANOS (например, либо потому что целевая последовательность содержится в нативной последовательности в локусе, либо потому что целевая последовательность была введена в локус, например, в результате рекомбинации), может применяться в определенных вариантах осуществления.

Некоторые примеры химерных полипептидов, которые могут применяться в конкретных вариантах осуществления изобретения, включают, без ограничения, комбинации следующих полипептидов: цинк-пальцевые ДНК-связывающие полипептиды, полипептид нуклеазы FokI, домены TALE, лейциновые молнии, ДНК-связывающие мотивы факторов транскрипции и распознающие и/или расщепляющие ДНК домены, выделенные, например, без ограничения, из TALEN, рекомбиназы (например, Cre, Hin, RecA, Tre и FLP рекомбиназы), РНК-направляемой CRISPR/Cas9, мегануклеазы, а также другие, известные специалистам. Конкретные примеры включают химерный белок, включающий сайт-специфический ДНК-связывающий полипептид и полипептид нуклеазы. Химерные полипептиды могут быть сконструированы способами, известными специалистам в данной области, с изменением распознаваемой последовательности ДНК-связывающего полипептида, содержащегося в химерном полипептиде для направления химерного полипептида к определенной нуклеотидной последовательности, представляющей интерес.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид включает ДНК-связывающий домен (например, цинковый палец, домен TAL-эффектора и т.д.) и нуклеазный (расщепляющий) домен. Расщепляющий домен может быть гетерологичным по отношению к ДНК-связывающему домену, например цинк-пальцевый ДНК-связывающий домен и расщепляющий домен из нуклеазы, или ДНК-связывающий домен TALEN и расщепляющий домен, или ДНК-связывающий домен мегануклеазы и расщепляющий домен из другой нуклеазы. Гетерологичные расщепляющие домены могут быть получены из любой эндонуклеазы или экзонуклеазы. Примеры эндонуклеаз, из которых может быть получен расщепляющий домен, включают, без ограничения, эндонуклеазы рестрикции и хоминг-эндонуклеазы. См., например, 2002-2003, Catalogue, New England Biolabs, Beverly, Mass.; Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. Известны дополнительные ферменты, которые расщепляют ДНК (например, нуклеаза 51, нуклеаза бобов мунг, панкреатическая ДНКаза I, нуклеаза микрококков, эндонуклеаза НО дрожжей; см. также Linn et al. (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Один или более указанных ферментов (или их функциональных фрагментов) могут использоваться в качестве источника расщепляющих доменов и расщепляющих полудоменов.

Аналогичным образом расщепляющий полудомен может быть получен из любой нуклеазы или ее части, как указано выше, и при этом требует димеризации для наличия расщепляющей активности. Как правило, для расщепления требуются два слитых белка, если слитые белки включают расщепляющие полудомены. В альтернативе может использоваться один белок, включающий два расщепляющих полудомена. Два расщепляющих полудомена могут быть получены из одной эндонуклеазы (или ее функциональных фрагментов) или каждый расщепляющий полудомен может быть получен из разных эндонуклеаз (или их функциональных фрагментов). Кроме того, сайты-мишени для двух слитых белков предпочтительно расположены по отношению друг к другу так, что связывание двух слитых белков с их соответствующим сайтом-мишенью помещает расщепляющие полудомены в такую ориентацию в пространстве по отношению друг к другу, которая позволяет расщепляющим полудоменам образовывать функциональный расщепляющий домен, например, при димеризации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ближние границы сайтов-мишеней отделены 5-8 нуклеотидами или 15-18 нуклеотидами. Впрочем, между двумя сайтами-мишенями может находиться любое целое число нуклеотидов или пар нуклеотидов (например, от 2 до 50 пар нуклеотидов или больше). Обычно расщепляемый сайт находится между сайтами-мишенями.

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) присутствуют во многих биологических видах и способны к сиквенс-специфическому связыванию ДНК (на участке распознавания) и расщеплению ДНК на сайте связывания или вблизи него, в результате чего, например, одна или более экзогенных последовательностей (доноров/трансгенов) интегрируются на сайтах (мишенях) связывания или вблизи них. Некоторые рестриктазы (например, IIS типа) расщепляют ДНК на сайтах, удаленных от участка распознавания, и имеют отдельные связывающий и расщепляющий домены. Например, фермент IIS типа FokI катализирует расщепление двухцепочечной ДНК на расстоянии 9 нуклеотидов от его участка распознавания на одной цепи и 13 нуклеотидов от его участка распознавания на другой. См., например, патенты США 5356802, 5436150 и 5487994; а также Li et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li et al.

(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982. Таким образом, в одном варианте осуществления слитые белки включают расщепляющий домен (или расщепляющий полудомен) по меньшей мере из одной рестриктазы IIS типа и один или более цинк-пальцевых связывающих доменов, которые могут быть сконструированными или нет.

Примером рестриктазы IIS типа, расщепляющий домен которой является отдельным от связывающего домена, является FokI. Данный конкретный фермент активен в виде димера. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570-10,575. Таким образом, в рамках настоящего описания часть фермента FokI, применяемая в раскрытых слитых белках, считается расщепляющим полудоменом. Таким образом, для направленного создания двухпочечного разрыва и/или направленной замены клеточных последовательностей с применением цинк-пальцевых-FokI слитых белков два слитых белка, каждый из которых включает расщепляющий полудомен FokI, могут применяться для воссоздания каталитически активного расщепляющего домена. В альтернативе также может применяться одна полипептидная молекула, содержащая ДНК-связывающий домен и два расщепляющих полудомена FokI.

Расщепляющий домен или расщепляющий полудомен могут быть любой частью белка, который сохраняет расщепляющую активность или сохраняет способность к мультимеризации (например, димеризации) с образованием функционального расщепляющего домена.

Примеры рестриктаз IIS типа описаны в патентной публикации США 2007/0134796, полностью включенной в настоящую заявку. Дополнительные рестриктазы также содержат отдельные связывающий и расщепляющий домены и рассматриваются в настоящем описании. См., например, Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31: 418-420.

В некоторых вариантах осуществления расщепляющий домен включает один или более сконструированных расщепляющих полудоменов (также называемых мутантными димеризационными доменами), которые минимизируют или предотвращают гомодимеризацию, как описано, например, в патентных публикациях США 2005/0064474, 2006/0188987 и 2008/0131962, все описания которых полностью включены в настоящую заявку посредством отсылки.

В альтернативе нуклеазы могут собираться *in vivo* на сайте-мишени нуклеиновой кислоты с применением так называемой технологии "сплит-энзим" (см., например, патентную публикацию США 2009/0068164). Компоненты таких сплит-энзимов могут экспрессироваться либо на отдельных экспрессионных конструкциях, либо могут быть связаны в одной открытой рамке считывания, где отдельные компоненты разделены, например, последовательностью саморасщепляющегося 2A пептида или IRES. Компоненты могут быть отдельными цинк-пальцевыми связывающими доменами или связывающими нуклеиновую кислоту доменами мегануклеазы.

Цинк-пальцевые нуклеазы.

В определенных вариантах осуществления химерный полипептид является специально сконструированной цинк-пальцевой нуклеазой (ZFN), которая может быть сконструирована для введения направленного сайт-специфического разрыва двойной цепи ДНК, в который может быть интегрирована экзогенная нуклеиновая кислота или донорная ДНК (см. находящуюся в совместном владении патентную публикацию США 2010/0257638, включенную в настоящую заявку посредством отсылки). ZFN представляют собой химерные полипептиды, содержащие неспецифичный расщепляющий домен из эндонуклеазы рестрикции (например, FokI) и полипептид цинк-пальцевого ДНК-связывающего домена. См., например, Huang et al. (1996) J. Protein Chem. 15:481-9; Kim et al. (1997a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3616-20; Kim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1156-60; Kim et al. (1994) Proc Natl. Acad. Sci. USA 91:883-7; Kim et al. (1997b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12875-9; Kim et al. (1997c) Gene 203:43-9; Kim et al. (1998) Biol. Chem. 379:489-95; Nahon and Raveh (1998) Nucleic Acids Res. 26:1233-9; Smith et al. (1999) Nucleic Acids Res. 27:674-81. В некоторых вариантах осуществления ZFN включают неканонические цинк-пальцевые ДНК-связывающие домены (см. находящуюся в совместном владении патентную публикацию США 2008/0182332, включенную в настоящую заявку посредством отсылки). Эндонуклеаза рестрикции FokI должна димеризоваться через нуклеазный домен для расщепления ДНК и введения разрыва двойной цепи. Следовательно, ZFN, содержащие нуклеазный домен из такой эндонуклеазы, также требуют димеризации нуклеазного домена для расщепления ДНК-мишени. Mani et al. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 334:1191-7; Smith et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28:3361-9. Димеризации ZFN могут способствовать два смежных, противоположно ориентированных ДНК-связывающих сайта (там же).

В конкретных примерах способ сайт-специфической интеграции экзогенной нуклеиновой кислоты по меньшей мере в один локус NANOS организма-хозяина включает введение в клетку-хозяина ZFN, где ZFN распознает и связывается с целевой нуклеотидной последовательностью, где целевая нуклеотидная последовательность содержится по меньшей мере в одном локусе NANOS организма-хозяина. В некоторых примерах целевая нуклеотидная последовательность не содержится в геноме организма-хозяина ни в одном другом положении, кроме по меньшей мере одного локуса NANOS. Например, ДНК-связывающий полипептид в ZFN может быть сконструирован, чтобы распознавать и связываться с целевой нуклеотидной последовательностью, идентифицированной по меньшей мере в одном локусе NANOS

(например, с помощью секвенирования локуса NANOS). Способ сайт-специфической интеграции экзогенной нуклеиновой кислоты по меньшей мере в один функциональный локус NANOS организма-хозяина, который включает введение ZFN в клетку-хозяина, также может включать введение в клетку экзогенной нуклеиновой кислоты, где рекомбинации экзогенной нуклеиновой кислоты в нуклеиновую кислоту организма-хозяина, включающего по меньшей мере один локус NANOS, способствует сайт-специфическое распознавание и связывание ZFN с последовательностью-мишенью (и последующее расщепление нуклеиновой кислоты, включающей локус NANOS).

Необязательные экзогенные нуклеиновые кислоты для интеграции в локус NANOS.

Варианты осуществления изобретения могут включать одну или более нуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из экзогенной нуклеиновой кислоты для сайт-специфической интеграции по меньшей мере в один локус NANOS, например, без ограничения, ORF, нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую эндонуклеазу, и вектора, включающего по меньшей мере одно или оба из предыдущего. Таким образом, конкретные нуклеиновые кислоты для применения в некоторых вариантах осуществления включают нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид, структурные нуклеотидные последовательности и/или сайты распознавания и связывания ДНК-связывающего полипептида.

Необязательные экзогенные молекулы нуклеиновых кислот для сайт-специфической интеграции.

Как отмечено выше, предложена вставка экзогенной последовательности (также называемой "донорной последовательностью", или "донором", или "трансгеном"), например, для экспрессии полипептида, коррекции мутантного гена или для повышения экспрессии гена дикого типа. Будет очевидно, что донорная последовательность обычно не идентична геномной последовательности, в которую ее помещают. Донорная последовательность может содержать негомологичную последовательность между двумя областями гомологии, чтобы обеспечивать эффективную HDR в нужном положении. Кроме того, донорные последовательности могут включать векторную молекулу, содержащую последовательности, которые не гомологичны представляющей интерес области в клеточном хроматине. Донорная молекула может содержать несколько дискретных областей гомологии к клеточному хроматину. Например, для направленной вставки последовательностей, которые обычно не содержатся в требуемой области, указанные последовательности могут присутствовать в донорной молекуле нуклеиновой кислоты и могут быть фланкированы областями гомологии к последовательности в области, представляющей интерес.

Донорный полинуклеотид может представлять собой ДНК или РНК, одноцепочечную или двухцепочечную, и может быть введен в клетку в линейной или кольцевой форме. См., например, патентные публикации США 2010/0047805, 2011/0281361, 2011/0207221 и заявку на патент США 13/889162. В случае введения в линейной форме концы донорной последовательности могут быть защищены (например, от экзонуклеолитической дегградации) способами, известными специалистам в данной области. Например, один или более дидезокси-нуклеотидных остатков присоединяют к 3'-концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируют с одним или обоими концами. См., например, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от дегградации включают, без ограничения, присоединение концевой аминогруппы (аминогрупп) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфоротиаты, фосфорамидаты и остатки О-метил-рибозы или дезоксирибозы.

Полинуклеотид может быть введен в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Кроме того, донорные полинуклеотиды могут быть введены в виде голый нуклеиновой кислоты, в виде комплекса с одним или более средствами доставки, такими как липосома или поллоксамер, или могут быть доставлены вирусами (например, аденовирусом, AAV, вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и интеграза-дефектным лентивирусом (IDLV)).

Донор обычно интегрируется таким образом, чтобы его экспрессию направлял эндогенный промотор на участке интеграции, а именно промотор, который направляет экспрессию эндогенного гена, в который интегрируется донор (например, NANOS). Впрочем, будет очевидно, что донор может включать промотор и/или энхансер, например конститутивный промотор, или индуцируемый промотор, или тканеспецифический промотор.

Кроме того, хотя это и не требуется для экспрессии, экзогенные последовательности могут также включать последовательности регуляции транскрипции или трансляции, например промоторы, энхансеры, инсуляторы, участки внутренней посадки рибосомы, кодирующие 2A пептиды последовательности и/или сигналы полиаденилирования.

Экзогенные нуклеиновые кислоты, которые могут быть интегрированы сайт-специфическим образом по меньшей мере в один локус NANOS с целью модификации локуса NANOS, в вариантах осуществления включают, например, без ограничения, нуклеиновые кислоты, включающие нуклеотидную последовательность, кодирующую требуемый полипептид, нуклеиновые кислоты, включающие агрономически ценный ген, нуклеиновые кислоты, включающие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу РНКи, или нуклеиновые кислоты, которые прерывают ген NANOS.

В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота интегрируется в локус NANOS, модифицируя локус NANOS, где нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, кодирующую требуемый полипептид, в результате чего нуклеотидная последовательность экспрессируется в организме-хозяине с локуса NANOS. В некоторых примерах требуемый полипептид (например, чужеродный белок) экспрессируется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей требуемый полипептид, в промышленных количествах. В таких примерах требуемый полипептид может быть выделен из клетки-хозяина, ткани или биомассы.

Молекулы нуклеиновой кислоты, включающие нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую эндонуклеазу.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая направляющую эндонуклеазу, может быть сконструирована путем манипуляции (например, лигирования) с нативными нуклеотидными последовательностями, кодирующими полипептиды, содержащиеся в направляющей эндонуклеазе. Например, нуклеотидная последовательность гена, кодирующего белок, включающий ДНК-связывающий полипептид, может быть исследована с целью идентификации нуклеотидной последовательности гена, который соответствует ДНК-связывающему полипептиду, при этом данная нуклеотидная последовательность может использоваться в качестве элемента нуклеотидной последовательности, кодирующей направляющую эндонуклеазу, включающую ДНК-связывающий полипептид. В альтернативе аминокислотная последовательность направляющей эндонуклеазы может использоваться для определения на ее основе нуклеотидной последовательности, кодирующей направляющую эндонуклеазу, например, согласно вырожденности генетического кода.

В примерах молекул нуклеиновых кислот, включающих нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую эндонуклеазу, последний кодон первой полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид нуклеазу, и первый кодон второй полинуклеотидной последовательности, кодирующей ДНК-связывающий полипептид, могут быть отделены любым количеством нуклеотидных триплетов, которые, например, не кодируют интрон или стоп-кодон. Аналогичным образом, последний кодон нуклеотидной последовательности, кодирующей первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую ДНК-связывающий полипептид, и первый кодон второй полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид нуклеазу, может быть отделен любым количеством нуклеотидных триплетов. В этих и других вариантах осуществления последний кодон (т.е. обычно 3' в последовательности нуклеиновой кислоты) первой полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид нуклеазу, и вторая полинуклеотидная последовательность, кодирующая ДНК-связывающий полипептид, могут быть слиты в фазовом регистре с первым кодоном другой кодирующей полинуклеотидной последовательности, непосредственно примыкающей к ним или отделенной от них не более чем короткой пептидной последовательностью, такой как последовательность, кодируемая синтетическим нуклеотидным линкером (например, нуклеотидным линкером, который мог использоваться для слияния). Примеры таких других полинуклеотидных последовательностей включают, например, без ограничения, метки, направляющие пептиды и сайты ферментативного расщепления. Аналогичным образом первый кодон большинства 5' (в последовательности нуклеиновой кислоты) первой и второй полинуклеотидных последовательностей может быть слит в фазовом регистре с последним кодоном другой кодирующей полинуклеотидной последовательности, непосредственно примыкающей к ним или отделенной от них не более чем короткой пептидной последовательностью.

Последовательность, отделяющая полинуклеотидные последовательности, кодирующие функциональные полипептиды в направляющей эндонуклеазе (например, ДНК-связывающий полипептид и полипептид нуклеазу), может, например, состоять из любой последовательности, причем кодируемая аминокислотная последовательность скорее всего не изменит значительно трансляцию направляющей эндонуклеазы. Из-за автономной природы известных нуклеазных полипептидов и известных ДНК-связывающих полипептидов промежуточные последовательности не будут, например, нарушать соответствующие функции таких структур.

Другие способы нокаута.

Различные другие методики, известные в уровне техники, могут применяться для инактивации генов с целью получения нокаутных животных и/или введения конструкции нуклеиновой кислоты в организм животных для получения животных-основателей и создания линий животных, в которых нокаут или конструкция нуклеиновой кислоты интегрирована в геном. Такие методики включают, без ограничения, пронуклеарную микроинъекцию (патент США 4873191), ретровирусный перенос генов в зародышевые линии (Van der Putten et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-1652), таргетинг генов в эмбриональных стволовых клетках (Thompson et al. (1989) Cell 56, 313-321), электропорацию эмбрионов (Lo (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814), опосредованный сперматозоидами перенос генов (Lavitano et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 14230-14235; Lavitano et al. (2006) Reprod. Fert. Develop. 18, 19-23) и *in vitro* трансформацию соматических клеток, таких как кумулюсные клетки, или клетки молочной железы, или зрелые, фетальные или эмбриональные стволовые клетки, с последующей трансплантацией ядер (Wilmut et al. (1997) Nature 385, 810-813; Wakayama et al. (1998) Nature 394, 369-374). Пронуклеарная микроинъекция, опосредованный сперматозоидами перенос генов и перенос ядра соматической клетки

являются наиболее полезными методиками. Животное, которое является геномно модифицированным, является таким животным, у которого все его клетки имеют генетическую модификацию, включая его клетки зародышевой линии. В случае когда используются такие способы, которые позволяют получить животное, являющееся мозаичным по его генетической модификации, животные могут быть инбредными. При этом можно отобрать потомство, которое модифицировано геномно. Клонирование, например, может использоваться для получения мозаичного животного, если его клетки модифицированы в состоянии бластоцисты, или геномная модификация может иметь место в случае модификации одиночной клетки. Животные, которые модифицированы таким образом, что они не являются половозрелыми, могут быть гомозиготными или гетерозиготными по модификации, в зависимости от конкретного подхода, который используют. Если конкретный ген инактивируют посредством нокаутной модификации, обычно требуется гомозиготность. Если конкретный ген инактивируют посредством РНК интерференции или доминантно-негативной стратегии, то часто требуется гетерозиготность.

Как правило, при микроинъекции эмбриона/зиготы в оплодотворенную яйцеклетку вводят конструкцию нуклеиновой кислоты или мРНК. Используют 1- или 2-клеточные оплодотворенные яйцеклетки, поскольку пронуклеусы, содержащие генетический материал из головки сперматозоида и яйцеклетки, видны в протоплазме. Оплодотворенные яйцеклетки на пронуклеарной стадии могут быть получены *in vitro* или *in vivo* (т.е. хирургически забраны из маточной трубы донорных животных). Оплодотворенные *in vitro* яйцеклетки могут быть получены следующим образом. Например, яичники свиньи можно собирать на бойне и выдерживать при 22-28°C во время транспортировки. Яичники можно промыть и изолировать для отбора фолликулов, при этом фолликулы размером от 4-8 мм можно отбирать в конические центрифужные пробирки объемом 50 мл при использовании игл 18 калибра и под вакуумом. Фолликулярная жидкость и забранные ооциты могут быть промыты через префильтры коммерческим TL-HEPES (Minitube, Verona, Wis.). Ооциты, окруженные компактной кумулюсной массой, могут быть отобраны и помещены в среду для созревания ооцитов TCM-199 (Minitube, Verona, Wis.) с добавкой 0,1 мг/мл цистеина, 10 нг/мл эпидермального фактора роста, 10% свиной фолликулярной жидкости, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 0,5 мг/мл цАМФ, по 10 МЕ/мл гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (PMSG) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), приблизительно на 22 ч в увлажненном воздухе при 38,7°C и 5% CO₂. Затем ооциты можно перенести в новую питательную среду для созревания TCM-199, не содержащую цАМФ, PMSG или ХГЧ, и инкубировать в течение еще 22 ч. Зрелые ооциты могут быть отделены от кумулюсных клеток при встряхивании на вортексе в 0,1% гиалуронидазе в течение 1 мин.

В случае свиньи зрелые ооциты могут быть оплодотворены в 500 мкл среды Minitube PORCPRO IVF MEDIUM SYSTEM (Minitube, Verona, Wis.) в 5-луночных планшетах для оплодотворения Minitube. При подготовке к экстракорпоральному оплодотворению (ЭКО или IVF) свежесобранная или замороженная сперма хряка может быть промыта и ресуспендирована в среде PORCPRO IVF до 4×10^5 сперматозоидов. Концентрацию сперматозоидов можно проанализировать с помощью компьютерной спермограммы (SPERMVISION, Minitube, Verona, Wis.). Конечное *in vitro* оплодотворение может быть выполнено в объеме 10 мкл при конечной концентрации приблизительно 40 подвижных сперматозоидов/ооцит в зависимости от хряка. Все оплодотворенные ооциты инкубируют при 38,7°C в атмосфере 5,0% CO₂ в течение 6 часов. Через шесть часов после оплодотворения предположительные зиготы могут быть промыты два раза в NCSU-23 и перенесены в 0,5 мл такой же среды. Такая система обычно может давать 20-30% бластоцист для большинства хряков с 10-30% полиспермного осеменения.

Линеаризованные конструкции нуклеиновых кислот или мРНК могут быть введены в один из пронуклеусов или в цитоплазму. Затем обработанные яйцеклетки могут быть перенесены реципиентной самке (например, в маточные трубы реципиентной самки) и оставлены для развития в реципиентной самке с целью получения трансгенных животных. В частности, оплодотворенные *in vitro* эмбрионы можно центрифугировать при 15000×g в течение 5 мин для осаждения липидов, что позволяет визуализировать пронуклеусы. Инъекции в эмбрионы могут быть выполнены с помощью инъектора Eppendorf FEMTOJET, после чего эмбрионы можно культивировать до образования бластоцист. Скорость дробления эмбрионов и образования бластоцист, а также их качество, можно регистрировать.

Эмбрионы могут быть хирургически перенесены в матки асинхронных реципиентов. Как правило, 100-200 (например, 150-200) эмбрионов можно депонировать в ампуло-перешеечное соединение маточной трубы при помощи 5,5-дюймового (12 см) катетера TOMCAT®. После операции может быть выполнено ультразвуковое исследование в реальном времени на беременность.

При переносе ядра соматической клетки трансгенная клетка (например, трансгенная клетка свиньи или коровы), такая как эмбриональный бластомер, фетальный фибробласт, зрелый фибробласт уха или гранулезная клетка, которая включает конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную выше, может быть введена в энуклеированный ооцит для образования комбинированной клетки. Ооциты могут быть энуклеированы частичным удалением зоны пеллюцида вблизи полярного тельца с последующим выдавливанием цитоплазмы в области разреза. Как правило, инъекционную пипетку с острым скошенным концом используют для введения трансгенной клетки в энуклеированный ооцит с остановкой деления в фазе мейоза II. В некоторых конвенциях ооциты с остановкой деления в фазе мейоза II называют яйцеклетка-

ми. После получения свиного или бычьего эмбриона (например, при слиянии и активации ооцита), эмбрион переносит в маточные трубы самки-реципиента приблизительно через 20-24 ч после активации. См., например, Cibelli et al. (1998) *Science* 280, 1256-1258 и патент США 6548741. В случае свиней самки-реципиенты могут быть проверены на наличие беременности приблизительно через 20-21 день после переноса эмбрионов.

Стандартные методики животноводства могут использоваться для создания животных, которые являются гомозиготными по экзогенной нуклеиновой кислоте из начальных гетерозиготных животных-основателей. Впрочем, гомозиготность может и не требоваться. Трансгенные свиньи, описанные в настоящей заявке, могут быть скрещены с другими представляющими интерес свиньями.

В некоторых вариантах осуществления требуемая нуклеиновая кислота и селективный маркер могут быть представлены на отдельных транспозонах и введены в эмбрионы или клетки в неравном количестве, где количество транспозона, содержащего селективный маркер, значительно превышает (в 5-10 раз) количество транспозона, содержащего требуемую нуклеиновую кислоту. Трансгенные клетки или животные, экспрессирующие требуемую нуклеиновую кислоту, могут быть выделены по наличию и экспрессии селективного маркера. Поскольку транспозоны интегрируются в геном точным и несцепленным способом (независимые события транспозиции), представляющая интерес нуклеиновая кислота и селективный маркер не сцеплены генетически и могут быть легко разделены генетической сегрегацией при стандартном размножении. Таким образом, могут быть получены трансгенные животные, которые не должны сохранять селективные маркеры в последующих поколениях, что представляет некоторую проблему, связанную с перспективой общественной безопасности.

После создания трансгенного животного экспрессию экзогенной нуклеиновой кислоты можно оценить при использовании стандартных методик. Первичный скрининг может быть выполнен с помощью Саузерн-блоттинга для определения, прошла ли интеграция конструкции. По поводу описания Саузерн-анализа, см. раздел 9.37-9.52 в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview; N.Y. Методики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) также могут использоваться при первичном скрининге. ПЦР относится к процедуре или методике, в которой происходит амплификация целевых нуклеиновых кислот. Обычно содержащаяся в последовательности информация от концов представляющей интерес области или за ними используется для подбора олигонуклеотидных праймеров, которые идентичны или подобны по последовательности противоположной цепи амплифицируемой матрицы. ПЦР может использоваться для амплификации определенных последовательностей с ДНК, равно как и с РНК, включая последовательности из суммарной геномной ДНК или суммарной клеточной РНК. Праймеры обычно имеют длину 14-40 нуклеотидов, но могут иметь длину от 10 нуклеотидов до сотен нуклеотидов. ПЦР описана, например, в *PCR Primer: A Laboratory Manual*, ed. Dieffenbach and Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Нуклеиновые кислоты также можно амплифицировать с помощью лигазной цепной реакции, амплификации с замещением цепей, самоподдерживающейся репликации последовательностей или амплификации на основе последовательности нуклеиновой кислоты. См., например, Lewis (1992) *Genetic Engineering News* 12,1; Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874; Weiss (1991) *Science* 254:1292. На стадии бластоцисты эмбрионы могут быть индивидуально обработаны для анализа ПЦР, Саузерн-гибридизации и ПЦР с использованием сплинкеров (см., например, Dupuy et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99:4495).

Экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в тканях трансгенных свиней можно оценить при использовании методик, которые включают, например, Нозерн-блоттинг образцов тканей, полученных у животного, анализ методом гибридации *in situ*, Вестерн-анализ, иммуноанализы, такие как твердофазные иммуноферментные анализы и ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

Интерферирующие РНК.

Известно множество систем интерферирующих РНК (РНКи). Двухцепочечная РНК (дцРНК) вызывает сиквенс-специфическую деградацию гомологичных транскриптов. РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC) метаболизирует дцРНК до небольших, длиной 21-23 нуклеотида, малых интерферирующих РНК (миРНК). RISC содержит РНКазу, расщепляющую двухцепочечную РНК (дцРНКазу, например, Dicer), и оцРНКазу (например, Argonaut 2 или Ago2). RISC использует антисмысловую цепь в качестве гида, чтобы находить расщепляемую мишень. Известны миРНК и микроРНК (мкРНК). Способ инактивации гена у генетически редактируемого животного включает РНК интерференцию в отношении гена-мишени и/или нуклеиновой кислоты, в результате чего экспрессия гена-мишени и/или нуклеиновой кислоты снижается.

Например, экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты может индуцировать РНК интерференцию против нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Например, двухцепочечная малая интерферирующая РНК (миРНК) или малая шпилечная РНК (мшРНК), гомологичные ДНК-мишени, могут использоваться для снижения экспрессии такой ДНК. Конструкции миРНК могут быть получены, как описано, например, в Fire et al. (1998) *Nature* 391:806; Romano and Masino (1992) *Mol. Microbiol.* 6:3343; Cogoni et al. (1996) *EMBO J.* 15:3153; Cogoni and Masino (1999) *Nature* 399:166; Misquitta and Paterson (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1451; и Kennerdell and Carthew (1998) *Cell* 95:1017. Конструкции

мшРНК могут быть получены, как описано McIntyre and Fanning (2006) BMC Biotechnology 6:1. Как правило, мшРНК транскрибируются в виде одноцепочечной молекулы РНК, содержащей комплементарные области, которые могут отжигаться и формировать короткие шпильки.

Вероятность обнаружения одной, отдельно функциональной миРНК или мкРНК, направленной против определенного гена, высока. Возможность предсказания определенной последовательности миРНК, например, составляет приблизительно 50%, однако множество интерферирующих РНК можно получить с достаточной уверенностью, что по меньшей мере одна из них будет эффективной.

Варианты осуществления включают клетку *in vitro*, клетку *in vivo* и генетически отредактированное животное, такое как сельскохозяйственное животное, которые экспрессируют РНКи, направленные против нейроэндокринного гена, селективного в отношении полового созревания. Вариантом осуществления является РНКи, направленная против гена в группе, состоящей из Gpr54, Kiss1 и GnRH1. РНКи может быть, например, выбрана из группы, состоящей из миРНК, мшРНК, дцРНК, RISC и мкРНК.

Индуктируемые системы.

Индуктируемая система может использоваться для регуляции экспрессии гена полового созревания. Известны различные индуцируемые системы, которые обеспечивают пространственно-временную регуляцию экспрессии гена. Некоторые из них, как было подтверждено, являлись функциональными *in vivo* в трансгенных животных.

Примером индуцируемой системы является система тетрациклин-зависимого tet-on промотора, которая может использоваться для регуляции транскрипции нуклеиновой кислоты. В этой системе мутантный Tet-репрессор (TetR) слит с доменом активации белка-трансактиватора VP 16 из вируса простого герпеса с получением тетрациклин-регулируемого активатора транскрипции (tTA), который регулируется tet или доксициклином (dox). В отсутствие антибиотика транскрипция минимальна, тогда как в присутствии tet или dox транскрипция индуцируется. Альтернативные индуцируемые системы включают системы экдизона или рапамицина. Экдизон является гормоном линьки насекомых, продукцию которого регулирует гетеродимер рецептора экдизона и продукт гена ультраспиракл (USP). Экспрессию индуцирует обработка экдизоном или аналогом экдизона, таким как муристерон А. Средство, которое вводят животному для активации индуцируемой системы, называется индуцирующим средством.

Тетрациклин-индуцируемая система и система Cre/loxP рекомбиназы (конститутивная или индуцируемая) являются одними из наиболее часто используемых индуцируемых систем. Тетрациклин-индуцируемая система включает регулируемый тетрациклином трансактиватор (tTA)/обратный tTA (rtTA). Способ применения таких систем *in vivo* включает создание двух линий генетически отредактированных животных. Одна линия животных экспрессирует активатор (tTA, rtTA или рекомбиназу Cre) под контролем выбранного промотора. Другой набор трансгенных животных экспрессирует акцептор. При этом экспрессия нужного гена (или модифицируемого гена) находится под контролем последовательности-мишени трансактиваторов tTA/rtTA (или фланкирована последовательностями loxP). Спаривание двух линий мышей обеспечивает регуляцию экспрессии гена.

Тетрациклин-зависимые регуляторные системы (tet-системы) основаны на двух компонентах, а именно тетрациклин-регулируемом трансактиваторе (tTA или rtTA) и tTA/rtTA-зависимом промоторе, который регулирует экспрессию последующей кДНК тетрациклин-зависимым образом. В отсутствие тетрациклина или его производных (таких как доксициклин) tTA связывается с последовательностями tetO, обеспечивая транскрипционную активацию tTA-зависимого промотора. Однако в присутствии доксициклина tTA не может взаимодействовать со своей мишенью и транскрипция не идет, а tet-система, в которой используется tTA, называется tet-OFF, потому что тетрациклин или доксициклин обеспечивают даун-регуляцию транскрипции. Введение тетрациклина или его производных обеспечивает временный контроль экспрессии трансгена *in vivo*. rtTA является вариантом tTA, который не функционален в отсутствие доксициклина, но требует присутствия лиганда для трансактивации. Поэтому такую tet-систему называют tet-ON. tet-системы использовались *in vivo* для индуцируемой экспрессии нескольких трансгенов, кодирующих, например, репортерные гены, онкогены или белки, задействованные в сигнальном каскаде.

В системе Cre/lox используется рекомбиназа Cre, которая катализирует сайт-специфическую рекомбинацию при кроссинговере между двумя удаленными последовательностями распознавания Cre, т.е. участками loxP. Последовательность ДНК, введенная между двумя последовательностями loxP (называемая "floxed", т.е. loxP-фланкированной, ДНК), вырезается в результате Cre-опосредованной рекомбинации. Контроль экспрессии Cre в трансгенном животном при использовании либо пространственной регуляции (с помощью ткане- или клеточно-специфического промотора), либо временной регуляции (с индуцируемой системой) обеспечивает контроль вырезания ДНК между двумя участками loxP. Одно применение служит для условной инактивации гена (условный нокаут). Другой подход предназначен для овер-экспрессии белка, где loxP-фланкированный стоп-кодон вставлен между последовательностью промотора и требуемой ДНК. Генетически отредактированные животные не экспрессируют трансген, пока не экспрессируется Cre, приводя к вырезанию loxP-фланкированного стоп-кодона. Эту систему применяли для тканеспецифического онкогенеза и регулируемой экспрессии антигенного рецептора в В-лимфоцитах. Также были созданы индуцируемые Cre рекомбиназы. Индуцируемая Cre рекомбиназа ак-

тивируется только при введении экзогенного лиганда. Индуцируемые Cre рекомбиназы представляют собой слитые белки, содержащие исходную рекомбиназу Cre и специфичный лиганд-связывающий домен. Функциональная активность рекомбиназы Cre зависит от внешнего лиганда, который способен связываться с таким специфичный доменом в слитом белке.

Варианты осуществления включают клетку *in vitro*, клетку *in vivo* и генетически редактированное животное, такое как сельскохозяйственное животное, которые включают нейроэндокринный ген, селективный в отношении полового созревания, который находится под контролем индуцируемой системы. Генетическая модификация животного может быть геномной или мозаичной. Вариантом осуществления является ген в группе, состоящей из *Gpr54*, *Kiss1* и *GnRH1*, который находится под контролем индуцируемой системы. Индуцируемая система может быть, например, выбрана из группы, состоящей из *Tet-On*, *Tet-Off*, *Cre-lox* и *Hif1 α* .

Векторы и нуклеиновые кислоты.

Множество нуклеиновых кислот может быть введено в клетки в целях нокаута для инактивации гена, получения экспрессии гена или в других целях. При использовании в настоящем описании термин нуклеиновая кислота включает ДНК, РНК и аналоги нуклеиновых кислот, а также нуклеиновые кислоты, которые являются двухцепочечными или одноцепочечными (т.е. смысловую или антисмысловую одиночную цепь). Аналоги нуклеиновых кислот могут быть модифицированы по остатку основания, остатку сахара или фосфатному скелету в целях улучшения, например, стабильности, гибридизации или растворимости нуклеиновой кислоты. Модификации по остатку основания включают дезоксиуридин вместо дезокситимидина и 5-метил-2'-дезокситидин и 5-бром-2'-дезокситидин вместо дезокситидина. Модификации остатка сахара включают модификацию 2'-гидроксила сахара рибозы с образованием 2'-О-метил или 2'-О-аллил сахаров. Дезоксирибозо-фосфатный скелет может быть модифицирован с получением морфолино-нуклеиновых кислот, в которых каждый остаток основания связан с шестичленным морфолиновым кольцом, или пептид-нуклеиновых кислот, в которых дезоксифосфатный скелет заменен псевдопептидным скелетом, и при этом сохраняются четыре основания. См., Summerton and Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7(3): 187; и Nurgun et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4:5. Кроме того, дезоксифосфатный скелет может быть заменен, например, фосфоротиоатным или фосфородитиоатным скелетом, фосфоамидитным или алкил-фосфотриэфирным скелетом.

Целевая последовательность нуклеиновой кислоты может быть функционально связана с регуляторной областью, такой как промотор. Регуляторные области могут быть регуляторными областями свиньи или могут быть из других видов. При использовании в настоящем описании "функционально связанный" относится к такому расположению регуляторной области по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, чтобы была обеспечена или облегчена транскрипция целевой нуклеиновой кислоты.

Любой тип промотора может быть функционально связан с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты. Примеры промоторов включают, без ограничения, тканеспецифические промоторы, конститутивные промоторы, индуцируемые промоторы и промоторы, чувствительные или нечувствительные к специфическому стимулирующему фактору. Подходящие тканеспецифические промоторы могут вызывать предпочтительную экспрессию транскрипта нуклеиновой кислоты в бета-клетках и включают, например, промотор инсулина человека. Другие тканеспецифические промоторы могут вызывать предпочтительную экспрессию, например, в гепатоцитах или ткани сердца и могут включать промоторы альбумина или тяжелой цепи альфа-миозина соответственно. В других вариантах осуществления может использоваться промотор, который облегчает экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты без значительной тканевой или временной специфичности (т.е. конститутивный промотор). Например, может использоваться промотор бета-актина, такой как промотор гена бета-актина курицы, промотор убиквитина, *miniCAGs* промотор, промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) или промотор 3-фосфоглицераткиназы (PGK), а также вирусные промоторы, такие как промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK), промотор SV40 или промотор цитомегаловируса (CMV). В некоторых вариантах осуществления в качестве промотора используется слитый с энхансером CMV промотор гена бета-актина курицы. См., например, Xu et al. (2001) *Hum. Gene Ther.* 12:563; Kiwaki et al. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:821.

Дополнительные регуляторные области, которые могут использоваться в конструкциях нуклеиновых кислот, включают, без ограничения, последовательности полиаденилирования, последовательности регуляции трансляции (например, сегмент внутренней посадки рибосомы, IRES), энхансеры, индуцируемые элементы или интроны. Такие регуляторные области могут не быть обязательными, хотя они могут увеличивать экспрессию, влияя на транскрипцию, стабильность мРНК, эффективность трансляции или подобное. Такие регуляторные области могут быть включены в конструкцию нуклеиновой кислоты при необходимости для получения оптимальной экспрессии нуклеиновых кислот в клетке(ах). Достаточная экспрессия, впрочем, может быть иногда получена без таких дополнительных элементов.

Может использоваться конструкция нуклеиновой кислоты, которая кодирует сигнальные пептиды или селективные маркеры. Сигнальные пептиды могут использоваться таким образом, чтобы кодируемый полипептид направлялся в определенное положение клетки (например, поверхность клетки). Неог-

раничивающие примеры селективных маркеров включают пурамицин, ганцикловир, аденозиндезаминазу (ADA), аминокликозидфосфотрансферазу (нео, G418, APH), дигидрофолатредуктазу (DHFR), гигромицин-В-фосфотрансферазу, тимидинкиназу (ТК) и ксантин-гуанинфосфорилтрансферазу (XGPRТ). Такие маркеры могут использоваться для отбора устойчивых трансформантов в культуре. Другие селективные маркеры включают флуоресцентные полипептиды, такие как зеленый флуоресцентный белок или желтый флуоресцентный белок.

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая селективный маркер, может быть фланкирована последовательностями распознавания рекомбиназы, такой как, например, Cre или Flp. Например, селективный маркер может быть фланкирован участками распознавания loxP (34 пн участки распознавания, распознаваемые рекомбиназой Cre) или участками распознавания FRT таким образом, чтобы селективный маркер мог вырезаться из конструкции. См., Orban, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1992) 89:6861, for a review of Cre/lox technology, и Brand and Dymecki, Dev. Cell (2004) 6:7. Транспозон, содержащий Cre- или Flp-активируемый трансген, прерванный селективным маркерным геном, также может использоваться для получения трансгенных животных с условной экспрессией трансгена. Например, промотор, направляющий экспрессию маркера/трансгена, может быть универсальным или тканеспецифическим, что приводит к повсеместной или тканеспецифической экспрессии маркера у животных F0 (например, свиней). Тканеспецифическая активация трансгена может быть достигнута, например, при скрещивании свиньи, у которой повсеместно экспрессируется прерванный маркером трансген, со свиньей, экспрессирующей Cre или Flp тканеспецифически, или при скрещивании свиньи, которая экспрессирует прерванный маркером трансген тканеспецифически, со свиньей, у которой повсеместно экспрессируется рекомбиназа Cre или Flp. Регулируемая экспрессия трансгена или регулируемое вырезание маркера обеспечивают экспрессию трансгена.

В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, может включать последовательность метки, которая кодирует "метку", созданную для облегчения последующей манипуляции в отношении кодируемого полипептида (например, облегчения локализации или обнаружения). Последовательности меток могут быть встроены в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, таким образом, чтобы кодируемая метка была расположена на С- или N-конце полипептида. Неограничивающие примеры кодируемых меток включают глутатион-S-трансферазу (GST) и метку FLAG™ (Kodak, New Haven, Conn.).

Конструкции нуклеиновых кислот могут быть метилированы при использовании SssI CpG-метилазы (New England Biolabs, Ipswich, Mass.). Обычно конструкцию нуклеиновой кислоты можно инкубировать с S-аденозилметионином и SssI CpG-метилазой в буфере при 37°C. Гиперметилирование может быть подтверждено при инкубировании конструкции с одной единицей эндонуклеазы HinPII в течение 1 ч при 37°C и анализе с помощью электрофореза в агарозном геле.

Конструкции нуклеиновых кислот могут быть введены в эмбриональные, фетальные или зрелые клетки животных любого типа, включающие, например, половые клетки, такие как ооцит, или яйцеклетку, клетку-предшественник, зрелую или эмбриональную стволовую клетку, первичную половую клетку, клетку почки, такую как клетка PK-15, островковую клетку, бета-клетку, клетку печени или фибробласт, такой как кожный фибробласт, при использовании множества методик. Неограничивающие примеры методик включают применение транспозонных систем, рекомбинантных вирусов, которые могут инфицировать клетки, или липосом или других невирусных способов, таких как электропорация, микроинъекция или осаждение фосфатом кальция, которые способны обеспечивать доставку нуклеиновых кислот в клетки.

В транспозонных системах единица транскрипции конструкции нуклеиновой кислоты, т.е. регуляторная область, функционально связанная с экзогенной последовательностью нуклеиновой кислоты, фланкирована инвертированным повтором транспозона. Некоторые транспозонные системы, включающие, например, Sleeping Beauty (см., патент США 6613752 и патентную публикацию США 2005/0003542); Frog Prince (Miskey et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:6873); Tol2 (Kawakami (2007) Genome Biology 8(Suppl.1):S7; Minos (Pavlopoulos et al. (2007) Genome Biology 8 (Suppl.1) :S2); Hsmarl (Miskey et al. (2007)) Mol Cell Biol. 27:4589); а также Passport, были разработаны для введения нуклеиновых кислот в клетки, включая клетки мышей, человека и свиньи. Транспозон "Спящая красавица" (Sleeping Beauty) является особенно полезным. Транспозаза может быть доставлена в виде белка, кодируемого на той же конструкции нуклеиновой кислоты, что и экзогенная нуклеиновая кислота, и может быть введена на отдельной конструкции нуклеиновой кислоты или представлена в виде мРНК (например, in vitro-транскрибируемой и кэпированной мРНК).

Инсуляторные элементы также могут быть включены в конструкцию нуклеиновой кислоты для поддержания экспрессии экзогенной нуклеиновой кислоты и ингибирования нежелательной транскрипции генов организма-хозяина. См., например, патентную публикацию США 2004/0203158. Как правило, инсуляторный элемент фланкирует каждую сторону единицы транскрипции и является внутренним по отношению к инвертированному повтору транспозона. Неограничивающие примеры инсуляторных эле-

ментов включают инсуляторные элементы по типу участков прикрепления к ядерному матриксу (MAR) и инсуляторные элементы бордерного типа. См., например, патенты США 6395549, 5731178, 6100448, 5610053 и патентную публикацию США 2004/0203158.

Нуклеиновые кислоты могут быть включены в векторы. Вектор является широким термином, который включает любой определенный сегмент ДНК, который разработан в целях перемещения от носителя в целевую ДНК. Вектор может называться вектором экспрессии или векторной системой, которая является набором компонентов, требуемых для осуществления вставки ДНК в геном или другую целевую последовательность ДНК, такую как эписома, плаزمиды или даже сегмент ДНК вируса/фага. Векторные системы, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы, аденоассоциированный вирус и интегрирующиеся вирусы бактерий) и невирусные векторы (например, транспозоны), используемые для доставки генов в животных, имеют следующие два основных компонента:

- 1) вектор, состоящий из ДНК (или РНК, которая подвергается обратной транскрипции в кДНК); и
- 2) транспозаза, рекомбиназа или другой фермент семейства интеграз, который распознает и вектор, и целевую последовательность ДНК, и встраивает вектор в целевую последовательность ДНК.

Векторы чаще всего содержат одну или более касет экспрессии, которые включают одну или более последовательностей регуляции экспрессии, где последовательность регуляции экспрессии является последовательностью ДНК, которая регулирует и управляет транскрипцией и/или трансляцией другой последовательности ДНК или мРНК соответственно.

Известны многие различные типы векторов. Например, известны плазмиды и вирусные векторы, например ретровирусные векторы. Плазмиды для экспрессии в клетках млекопитающих обычно имеют точку начала репликации, подходящий промотор и необязательный энхансер, необходимые сайты связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорные и акцепторные сайты сплайсинга, последовательности терминации транскрипции и 5'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности. Примеры векторов включают плазмиды (которые также могут быть носителем другого типа вектора), аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус (например, модифицированный ВИЧ-1, ВАО или ВИК), ретровирус (например, ASV, ALV или MoMLV) и транспозоны (например, Sleeping Beauty, P-элементы, Tol-2, Frog Prince, piggyBac).

При использовании в настоящем описании термин нуклеиновая кислота относится к РНК, и к ДНК, в том числе, например, кДНК, геномной ДНК, синтетической (например, химически синтезированной) ДНК, а также природным и химически модифицированным нуклеиновым кислотам, например синтетическим основаниям или альтернативным скелетам. Молекула нуклеиновой кислоты может быть двухцепочечной или одноцепочечной (т.е. смысловой или антисмысловой одиночной нитью). Термин трансгенный широко используется в настоящем описании и относится к генетически редактированному организму или генно-инженерно сконструированному организму, генетический материал которого был изменен при использовании методик генной инженерии. Нокаутное животное является, таким образом, трансгенным независимо от того, экспрессируются ли в животном или его потомстве экзогенные гены или нуклеиновые кислоты.

Животные-основатели, линии животных, признаки и репродукция.

Животные-основатели могут быть получены с помощью клонирования и других способов, описанных в настоящей заявке. Основатели могут быть гомозиготными по генетической модификации, как в случае, когда зигота или первичная клетка подвергаются гомозиготной модификации. Аналогичным образом могут быть также созданы основатели, которые являются гетерозиготными. В случае нокаутов NANOS основатели предпочтительно являются гетерозиготными. Основатели могут быть модифицированы геномно, подразумевая, что все клетки в их геноме подверглись модификации. Основатели могут быть мозаичными по модификации, что может случиться, когда векторы вводят в одну из множества клеток в эмбрионе обычно на стадии бластоцисты. Потомство мозаичных животных может быть протестировано с целью идентификации потомства, которое модифицировано геномно. Линию животных создают при создании пула животных, который может быть воспроизведен половым размножением или с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, при этом гетерогенное или гомозиготное потомство будет стабильно экспрессировать модификацию.

У домашнего скота, как известно, многие аллели связаны с различными признаками, такими как признаки продуктивности, типовые признаки, признаки перерабатываемости и другие функциональные признаки. Специалисты имеют навыки контроля и количественного определения таких признаков, например, Visscher et al., *Livestock Production Science*, 40 (1994) 123-137, патент США 7709206, US 2001/0016315, US 2011/0023140 и US 2005/0153317. Линия животных может включать признак, выбранный из признаков в группе, состоящей из признаков продуктивности, типовых признаков, признаков перерабатываемости, признаков фертильности, материнских признаков и признаков устойчивости к болезням. Другие признаки включают экспрессию продукта рекомбинантного гена.

Животные с требуемым признаком или признаками могут быть модифицированы с целью предотвращения их полового созревания. Поскольку животные бесплодны до наступления половой зрелости, можно регулировать половую зрелость как средство контроля распространения животных. Животные, которые были скрещены или модифицированы с целью приобретения одного или более признаков, могут

быть, таким образом, предоставлены реципиентам с пониженным риском того, что реципиенты будут скрещиваться с такими животными и сами приобретут качество признаков. Варианты осуществления изобретения включают генетическую модификацию генома животного, где модификация включает инактивированный ген полового созревания, где ген полового созревания у животного дикого типа экспрессирует фактор, селективный в отношении полового созревания. Варианты осуществления включают обработку животного путем введения соединения с целью устранения дефицита, вызванного потерей экспрессии гена, активирующего половое созревание у животного.

Выращивание животных, которым требуется введение соединения для индукции половой зрелости, может быть успешно выполнено на обрабатывающем предприятии. Обрабатывающее предприятие может применять стандартные протоколы по обработке строго контролируемых партий скота для эффективного производства единообразных животных. Потомство животных может распределяться по множеству участков для выращивания. Фермы и фермеры (термин включает ранчо и владельцев ранчо) могут, таким образом, заказывать нужное количество потомства с указанным диапазоном возрастов, и/или веса, и/или признаков и принимать их в требуемое время и/или в требуемом месте. Реципиенты, например фермеры, могут затем выращивать животных и поставлять их на рынок по своему желанию.

Варианты осуществления включают доставку (например, в одно или более мест, во множество фермерских хозяйств) генетически редактированного сельскохозяйственного животного, имеющего инактивированный нейроэндокринный ген, селективный в отношении полового созревания. Варианты осуществления включают доставку животных, имеющих возраст от приблизительно 1 дня до приблизительно 180 дней. Животное может иметь один или более признаков (например, животное экспрессирует требуемый признак, или признак высокой ценности, или новый признак, или рекомбинантный признак). Варианты осуществления дополнительно включают предоставление указанного животного и/или разведение указанного животного.

Все источники, включая публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в настоящем описании, включены посредством отсылки в той мере, в какой они не противоречат прямо определенным деталям настоящего описания, и таким образом включены в той степени, как если бы было указано, что каждый источник индивидуально и прямо включен посредством отсылки и полностью представлен в настоящей заявке. Источники, обсуждаемые в настоящей заявке, представлены исключительно для их представления до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящей заявке не должно считаться допущением того, что авторы изобретения не обладают правом противопоставлять такое описание в силу приоритета изобретения.

Примеры осуществления изобретения

Следующие примеры представлены в целях иллюстрации некоторых конкретных особенностей и/или вариантов осуществления. Не следует считать, что примеры ограничивают описание конкретными особенностями или представленными вариантами осуществления.

Пример 1.

Разработка, конструкция и тестирование свиных NANOS2 TALEN реагентов.

Свиной NANOS2 расположен на хромосоме 6 и представляет собой один экзон, кодирующий белок из 138 аминокислот. Множественное выравнивание последовательностей с использованием независимых последовательностей свиньи выполняли с целью идентификации потенциальных однонуклеотидных полиморфизмов (обозначенных точками на фиг. 1) и при возможности избегали их во время отбора участков связывания TALEN.

Потенциальные участки для связывания свиных NANOS2 TALEN идентифицировали вблизи от 5'-конца данного гена при использовании средства, свободно доступного на сайте www.zifit.partners.org. Три пары TALEN были созданы при использовании протокола сборки TALEN Golden Gate (Cermak et al., NAR 2011, 39(12):e82). Правую сборку TALEN клонировали в приемный вектор pCAG-T7-TALEN (Sangamo)-FokI-KKR-Destination, а левую - в pCAG-T7-TALEN (Sangamo)-FokI-ELD-Destination. Аналитическую рестрикцию выполняли при использовании ферментов BspEI и StuI/AatII, и положительные клоны подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Свиные NANOS2 TALEN

A SEQ ID NO:75

TGCCATGCAGCTGCCACCCTTTGACATGTGGAAGGACTACTTCAACCTGAGCCA

18:18:18

A Левый: 5' TGCCATGCAG CTGCCACC SEQ ID NO:76

A Правый: 5' TGGCTCAGGT TGAAGTAG SEQ ID NO:77

A Левый

- 1) NG1-NN2-HD3-HD4-NI5-NG6-NN7-HD8-NI9-NN10 - pFUS_A
 2) HD1-NG2-NN3-HD4-HD5-NI6-HD7 - pFUS_B7

А Правый

- 1) NG1-NN2-NN3-HD4-NG5-HD6-NI7-NN8-NN9-NG10 - pFUS_A
 2) NG1-NN2-NI3-NI4-NN5-NG6-NI7 - pFUS_B7

B SEQ ID NO:78

TTTGACATGTGGAAGGACTACTTCAACCTGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGA

18:16:18

В Левый: 5' TTTGACATGT GGAAGGAC SEQ ID NO:79

В Правый: 5' TCAGTCCCAA CACCACCT SEQ ID NO:80

В Левый

- 1) NG1-NG2-NG3-NN4-NI5-HD6-NI7-NG8-NN9-NG10 - pFUS_A
 2) NN1-NN2-NI3-NI4-NN5-NN6-NI7 - pFUS_B7

В Правый

- 1) NG1-HD2-NI3-NN4-NG5-HD6-HD7-HD8-NI9-NI10 - pFUS_A
 2) HD1-NI2-HD3-HD4-NI5-HD6-HD7 - pFUS_B7

C SEQ ID NO:81

TCAACCTGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAATCGTCGACAAGGGCCA

18:17:18

С Левый: 5' TCAACCTGAG CCAGGTGG SEQ ID NO:82

С Правый: 5' TGGCCCTTGT CGACGATT SEQ ID NO:83

С Левый

- 1) NG1-HD2-NI3-NI4-HD5-HD6-NG7-NN8-NI9-NN10 - FUS_A
 2) HD1-HD2-NI3-NN4-NN5-NG6-NN7 - pFUS_B7

С Правый

- 1) NG1-NN2-NN3-HD4-HD5-HD6-NG7-NG8-NN9-NG10 - FUS_A
 2) HD1-NN2-NI3-HD4-NN5-NI6-NG7 - pFUS_B7

Свиные клетки почек PK15 культивировали в DMEM с высокой концентрацией глюкозы (Life Technologies, #31966), с добавкой 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в CO₂-инкубаторе с увлажнением, при 37°C и 5% CO₂. Один микрограмм не содержащей эндотоксинов плазмидной ДНК *tax1prer*, кодирующей каждую половину TALEN пар А, В или С, вместе с 1 мкг плазмиды, кодирующей CMV-контролируемый eGFP, совместно трансфицировали в 6×10⁵ клеток PK15 при использовании электропоратора Neon, установленного в режим 2 импульсов 1400 мВ по 20 мс каждый. Трансфицированные клетки регенерировали в полной среде без антибиотика. Через 24 ч после трансфекции клетки переносили из 37°C в инкубатор на 30°C и выдерживали в нем в течение 48 ч. GFP+ клетки выделяли с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток, размножали при культивировании и выделяли геномную ДНК при использовании набора Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit. ПЦР геномной ДНК выполняли при использовании полимеразы высокой точности Accuprime с ПЦР-праймерами oSL9 и oSL10

oSL9

(SEQ ID NO:84) 5'AGCGGGCAGTACTTGAGTGT

oSL10

(SEQ ID NO:85) 5'CCAGAAAACCTTCTGCTGCT

Анализ Cell ПЦР-продуктов проводили согласно рекомендациям производителя (Transgenomic). Расщепленные ПЦР-продукты разделяли в 2% агарозном TE геле (фиг. 2). Неожиданно обнаружили существенные различия в эффективности, с которой пары TALEN были способны вызывать NHEJ события на своих сайтах-мишенях. Низкую активность отмечали для TALEN пары А (стрелка около дорожки А на правой стороне фото на фиг. 2), причем активность не поддавалась обнаружению для TALEN пары В и была наилучшей для TALEN пары С (стрелка около дорожки С на правой стороне фото на фиг. 2).

Разработка, конструкция и тестирование свиных NANOS2 CRISPR реагентов.

Потенциальные сайты-мишени малых направляющих РНК первоначально идентифицировали по присутствию смежных с протоспейсером мотивов (PAM) в кодирующей последовательности гена

NANOS2 свиньи (что определяли по присутствию двух последовательных остатков гуанина в смысловой или в антисмысловой ориентации в указанной кодирующей последовательности). Сайты, идентифицированные таким образом, которые охватывали потенциальный сноп (обозначенный точками на фиг. 1, исключали из дальнейшего анализа. Каждый из оставшихся сайтов анализировали на потенциальное связывание вне мишени при использовании алгоритма BLAST (ncbi.nlm.nih.gov) с целью выполнить анализ генома свиньи на соответствие последовательностей. Был выбран один сайт связывания мнРНК, который, как оказалось, обладал высокой специфичностью для гена NANOS2 в свином геноме. Эта последовательность длиной 20 пар оснований по счастливой случайности содержала последовательность РАМ в каждой ориентации.

Связывающие сайты NANOS2

5' ccagaatcgtcgcacaagggccagagg 3' (SEQ ID NO:86)

3' ggctttagcagctgttccccggtctcc 5' (SEQ ID NO:87)

Подчеркнутая последовательность представляет собой связывающий сайт для свиных NANOS2 направляющих последовательностей в смысловой и в антисмысловой ориентации (SEQ ID NO: 86 и 87). На смысловой цепи РАМ обозначен последовательностью agg, 3' к сайту-мишени. На антисмысловой цепи РАМ обозначен последовательностью tgg, 3' к сайту-мишени.

Прямой и обратный варианты идентифицированной связывающей последовательности направляющей РНК были созданы и расположены как gBlocks (IDT) с промотором U6 человека, направляющим экспрессию мнРНК-связывающей последовательности, каркасом направляющей РНК (также называемый Cas9-связывающим доменом) и последовательностью терминатора (поли Т) (фиг. 3А и 3В). Блоки ДНК gBlock клонировали в плазмиду и получали не содержащую эндотоксинов плазмидную ДНК (Qiagen) (фиг. 3С). Три плазмиды, кодирующие последовательность мнРНК, CAG-направляемую Cas9 и CMV-направляемый eGFP соответственно, совместно трансфицировали в 6×10^5 клеток PK15 при использовании электропоратора Neon, установленного в режим 2 импульсов 1400 мВ по 20 мс каждый. Трансфицированные клетки регенерировали в полной среде без антибиотика. Через три дня после трансфекции GFP-положительные клетки выделяли с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток, размножали при культивировании и выделяли геномную ДНК при использовании набора Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit. ПЦР этой геномной ДНК выполняли при использовании полимеразы высокой точности Accuprime с ПЦР-праймерами oSL9 и oSL10. Анализ Cell ПЦР-продуктов проводили согласно рекомендациям производителя (Transgenomic). Расщепленные ПЦР-продукты разделяли в 2% агарозном ТЕ геле (фиг. 4). Хотя обе направляющих последовательности вызывали разрез и образование NHEJ на целевом сайте (что подтверждалось присутствием продуктов расщепления Cell, две нижние стрелки справа на фиг. 4). Неожиданно было обнаружено, что последовательность мнРНК в обратной ориентации относительно кодирующей последовательности была существенно более эффективной, чем ее смысловая копия.

Пример 2.

Разработка, конструкция и тестирование бычьих NANOS2 CRISPR реагентов.

Потенциальные сайты-мишени для онРНК первоначально идентифицировали по присутствию последовательностей РАМ в кодирующей последовательности бычьего гена NANOS2 или в последовательности, непосредственно примыкающей к кодирующей последовательности. Каждый потенциальный сайт анализировали на потенциальное связывание вне мишени при использовании алгоритма BLAST (ncbi.nlm.nih.gov), с целью анализа бычьего генома на соответствия последовательностей. Были выбраны девять потенциальных онРНК-связывающих сайтов (три сайта - 5' относительно кодирующей последовательности, три - в кодирующей последовательности, и три - 3' относительно стоп-кодона), которые, как оказалось, обладали высокой специфичностью в отношении гена NANOS2 в бычьем геноме.

Для каждого идентифицированного онРНК-связывающего сайта были разработаны 2 направляющих последовательности, 20-мерная связывающая последовательность и 19-, 18- или 17-мерная связывающая последовательность. См. табл. 1 и фиг. 12.

Таблица 1

oSL48	caccggtctttgggaatataaaag	прямой олиг для бычьего NANOS2 5'гида 1 20-мер
oSL49	aaaccttttatattcccaaagacc	обратный олиг для бычьего NANOS2 5'гида 1 20-мер
oSL50	caccgtctttgggaatataaaag	прямой олиг для бычьего NANOS2 5'гид 1 19-мер
oSL51	aaaccttttatattcccaaagac	обратный олиг для бычьего NANOS2 5'гид 1 19-мер

oSL52	caccgctttgcttagaagggtcttt	прямой олиг для бычьего NANOS2 5'гид 2 20-мер
oSL53	aaacaaagacccttctaagcaaagc	обратный олиг для бычьего NANOS2 5'гид 2 20-мер
oSL54	caccgttgcttagaagggtcttt	прямой олиг для бычьего NANOS2 5'гид 2 18-мер
oSL55	aaacaaagacccttctaagcaac	обратный олиг для бычьего NANOS2 5'гид 2 18-мер
oSL56	caccgagctccacctttgcttagaa	прямой олиг для бычьего NANOS2 5'гид 3 20-мер
oSL57	aaacttctaagcaaagggtggagctc	обратный олиг для бычьего NANOS2 5'гид 3 20-мер
oSL58	caccgctccacctttgcttagaa	прямой олиг для бычьего NANOS2 5'гид 3 19-мер
oSL59	aaacttctaagcaaagggtggagc	обратный олиг для бычьего NANOS2 5'гид 3 19-мер
oSL60	caccggcaagggttgagaccsaa	прямой олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 1 20-мер
oSL61	aaacttgggtctccaacccttgcc	обратный олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 1 20-мер
oSL62	caccgcaagggttgagaccsaa	прямой олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 1 19-мер
oSL63	aaacttgggtctccaacccttgcc	обратный олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 1 19-мер
oSL64	caccgccgagaccgggccccatg	прямой олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 2 20-мер
oSL65	aaaccatggggcccggtctcgcc	обратный олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 2 20-мер
oSL66	caccgagaccgggccccatg	прямой олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 2 17-мер
oSL67	aaaccatggggcccggtctc	обратный олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 2 17-мер
oSL68	caccgccccatgtggagcaggatcag	прямой олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 3 20-мер
oSL69	aaacctgatcctgctccacatgggc	обратный олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 3 20-мер
oSL70	caccgcatgtggagcaggatcag	прямой олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 3 18-мер
oSL71	aaacctgatcctgctccacatg	обратный олиг для бычьего NANOS2 внутренний гид 3 18-мер
oSL72	caccgtccccatctctggactcgtc	прямой олиг для бычьего NANOS2 3'гид 1 20-мер
oSL73	aaacgacgagtcagagatggggac	обратный олиг для бычьего NANOS2 3'гид 1 20-мер
oSL74	caccgccccatctctggactcgtc	прямой олиг для бычьего NANOS2 3'гид 1 18-мер
oSL75	aaacgacgagtcagagatgggc	обратный олиг для бычьего NANOS2 3'гид 1 18-мер
oSL76	caccgtctggactcgtcggccctt	прямой олиг для бычьего NANOS2 3'гид 2 20-мер
oSL77	aaacaagggccggacgagtcagac	обратный олиг для бычьего NANOS2 3'гид 2 20-мер
oSL78	caccggactcgtcggccctt	прямой олиг для бычьего NANOS2 3'гид 2 17-мер
oSL79	aaacaagggccggacgagtc	обратный олиг для бычьего NANOS2 3'гид 2 17-мер
oSL80	caccgtctcagtacttgatccctgc	прямой олиг для бычьего NANOS2 3'гид 3 20-мер
oSL81	aaacgcagggatcaagtactgagac	обратный олиг для бычьего NANOS2 3'гид 3 20-мер
oSL82	caccgtcagtacttgatccctgc	прямой олиг для бычьего NANOS2 3'гид 3 18-мер
oSL83	aaacgcagggatcaagtactgac	обратный олиг для бычьего NANOS2 3'гид 3 18-мер

Направляющие последовательности ПНК были созданы как пара олигонуклеотидов, которые при отжиге можно клонировать по сайтам BbsI плазмиды рх458 (фиг. 5А, 5В и 5С). В результате получили одну плазмиду с последовательностью онПНК под контролем U6 человека с последующей CAG-направляемой Cas9 с 2А-отщепляемым GFP. Список плазмид приведен в табл. 2 и на фиг. 12.

Таблица 2

pSL32	oSL48/49	клонирован в рх458
pSL33	oSL50/51	клонирован в рх458
pSL34	oSL52/53	клонирован в рх458
pSL35	oSL54/55	клонирован в рх458
pSL36	oSL56/57	клонирован в рх458
pSL37	oSL58/59	клонирован в рх458
pSL38	oSL60/61	клонирован в рх458
pSL39	oSL64/65	клонирован в рх458
pSL40	oSL66/67	клонирован в рх458
pSL41	oSL68/69	клонирован в рх458
pSL42	oSL70/71	клонирован в рх458
pSL43	oSL72/73	клонирован в рх458
pSL44	oSL74/75	клонирован в рх458
pSL45	oSL76/77	клонирован в рх458
pSL46	oSL78/79	клонирован в рх458
pSL47	oSL80/81	клонирован в рх458
pSL48	oSL82/83	клонирован в рх458
pSL49	oSL62/63	клонирован в рх458

Один микрограмм плазмидной минипреп ДНК (Qiagen) трансфицировали в 6×10^5 бычьих эмбриональных фибробластных клеток (BEF) при использовании электропоратора Neon, установленного в режим одиночного импульса 1800 мВ длительностью 20 мс. Через два дня после трансфекции геномную ДНК получали при использовании набора Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit. ПЦР геномной ДНК выполняли при использовании полимеразы высокой точности Accuprime с ПЦР-праймерами OSL86 и OSL87.

oSL86 agacgggtctttccagaggt (SEQ ID NO:64)

oSL87 acaagagtcctggagagctga (SEQ ID NO:74)

Анализ с T7 эндонуклеазой выполняли на очищенных ПЦР-продуктах согласно рекомендациям производителя (NEB).

Расщепленные ПЦР-продукты разделяли в 1,4% агарозном ТЕ геле (фиг. 6А и 6В). Неожиданно выявили существенные различия, обнаруженные в эффективности, с которой онРНК были способны вызывать образование NHEJ на своих целевых сайтах (что подтверждалось присутствием продуктов расщепления эндонуклеазы T7, стрелки справа от дорожек 32, 33, 38-41, 42 и 49 на фиг. 6А и 6В).

Направляющие последовательности с самой высокой по результатам анализа с эндонуклеазой T7 активностью в отношении NHEJ комбинировали в пары, при этом расщепление по обоим сайтам-мишеням в клетке потенциально может вызывать делецию последовательности, расположенной между ними. Один микрограмм каждой из плазмид pSL32+pSL38, pSL32+pSL39, pSL32+pSL42, pSL33+pSL38, pSL33+pSL39 или pSL33+pSL42 трансфицировали в 6×10^5 клетки BEF. Трансфекцию, культивирование и получение ДНК из клеток BEF проводили, как указано выше. ПЦР геномной ДНК выполняли при использовании полимеразы высокой точности Accuprime с ПЦР-праймерами oSL86 и oSL87 и разделяли продукты в 1,4% агарозном ТЕ геле (фиг. 7). Все шесть комбинаций плазмид продемонстрировали, что помимо полноразмерного ПЦР-продукта трансфицированные популяции клеток также несли усеченные фрагменты гена NANOS2, имеющие размер, характерный для используемой комбинации последовательностей онРНК (стрелки внутри фото геля на фиг. 7).

Эти усеченные фрагменты вырезали из геля и выделяли ДНК из агарозы, центрифугируя фрагмент геля на фильтре Spin-X для центрифужных пробирок (Costar #8163). Очищенные продукты клонировали в вектор pCR 4-TOPO при использовании набора TOPO TA Cloning Kit для секвенирования (Invitrogen #45-0030) и трансформировали в компетентные клетки XL-1 Blue (Agilent Technologies #200249). Трансформированные бактерии сеяли на чашки с LB агаром, содержащие 100 мкг/мл ампициллина, и культивировали при 37°C в течение ночи. Отбирали по пять колоний с каждой чашки и выращивали в течение ночи в среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Плазмиду выделяли при использовании системы PureYield Plasmid Miniprep (Promega #A1223) и направляли на секвенирование (Edinburgh Genomics) с использованием праймера oSL86. Выравнивание последовательностей демонстрирует, что делеция в целевой последовательности присутствовала в каждом случае (фиг. 8). Точное соединение концов между концами удаленных фрагментов обнаружили по меньшей мере в одном клоне после каждой трансфекции, тогда как другие клоны демонстрировали больше неточных событий, указывая на дополнительную модификацию в последовательности, произошедшую в ходе процесса соединения концов. Все клоны, секвенированные из комбинации pSL33+pSL38, показали идентичные, точные события соединения концов.

Данный подход указывает, что можно, а зачастую и нужно вызвать в гене-мишени специфичные делеции, которые приводят к потере или снижению экспрессии кодируемого белка, либо к изменению

функции транслируемого в результате белка, в качестве дополнительной стратегии к индукции NHEJ и последующих мутаций со сдвигом рамки считывания.

Пример 3.

Система CRISPR/Cas для генетической абляции.

После успешной проверки в клеточной культуре, как показано на фиг. 4, направляющую последовательность собирали с промотором T7 и синтезировали в формате G-block (IDT technologies). Сборка с конструкцией под контролем T7 необходима для *in vitro* транскрипции и продукции РНК. Кратко, онРНК транскрибировали при использовании набора для T7 транскрипции *in vitro* (Ambion). Аналогичным образом плазида Cas9 была получена из Addgene (плазида #42234; название: pMJ920) и мРНК Cas9 транскрибировали при использовании набора для *in vitro* транскрипции T7 Megascript (фиг. 9А).

Обе мРНК Cas9 (100 нг/мкл) и онРНК, направленную против NANOS2 (50 нг/мкл), вводили в 1-клеточные свиные зиготы с помощью инжектора Eppendorf Femtojet в режиме непрерывного потока. После инъекции эмбрионам позволяли развиваться до стадии бластоцисты (фиг. 9С) в течение еще 6 дней, а затем ДНК выделяли и подвергали ПЦР амплификации вокруг целевого сайта. Наличие делеций целевого гена (вследствие NHEJ репарации) оценивали с помощью секвенирования ПЦР-ампликонов. Как показано на фиг. 9D, был продемонстрирован успешный таргетинг локуса NANOS2. Последовательность, окружающую целевой сайт CRISPR в NANOS2, амплифицировали с использованием генспецифических праймеров, клонировали в вектор PCR2.1 (Invitrogen), трансформировали клетки DH5 α (NEB) и отбирали трансформанты по устойчивости к канамицину. Колонии культивировали в течение ночи, выделяли плазмидную ДНК (минипреп) и секвенировали плазмиды с помощью секвенирования по Сэнгеру. На фиг. 9 "N" обозначает аллель NANOS2, где первая цифра соответствует номеру бластоцисты, а второе число, указанное через дефис, соответствует бактериальному клону, содержащему амплифицированный NANOS2. На фигуре показаны репрезентативные последовательности из клонов с указанием делеций "-" вокруг предсказанного сайта разреза CRISPR. Последовательности из 8 различных бластоцист показали успешную делецию и прерывание открытой рамки считывания NANOS2 с образованием нокаутных аллелей - показаны на фиг. 9D.

Также была выбрана последовательность второй онРНК для NANOS2. GAA-GACACCGGAGGGCGTGGTGG (SEQ ID NO: 7). Эту мишень и более раннюю мишень GAATCG-TCCACAAGGGCCAGAGG (SEQ ID NO: 8) совместно вводили в одноклеточные эмбрионы и культивировали с целью анализа ДНК бластоцист, продемонстрировавшего наличие делеций и нокаут аллелей NANOS2 (см. фиг. 10).

Применение никазных пар для таргетинга гена.

Нуклеаза Cas9 вводит двухцепочечные разрывы в ДНК. В отличие от этого никаза Cas9 создает разрез (или ник) только в одной из двух цепей ДНК. При создании конструкций, направленных против мишеней, расположенных в непосредственной близости на противоположных цепях, парные никазы могут вводить двухцепочечные разрывы и, следовательно, могут вызывать делеции с высокой точностью. Преимущество применения парных никаз в сравнении с нуклеазами состоит в том, что, даже если Cas9 никаза демонстрирует нецелевое связывание, будет разрезана только одна из двух цепей, которая может быть эффективно восстановлена без нежелательных модификаций на нецелевом участке. Впрочем, при использовании в комбинации в непосредственной близости никазы вызывают направленное расщепление ДНК. Пара никаз была создана для направленного воздействия на свиной ген NANOS2. Однако никазы не были эффективны при введении мутаций (фиг. 11). Пара одиночных направляющих РНК была создана для направленного воздействия на противоположные цепи. Обе онРНК показаны в выделенной рамкой секции на фиг. 11, при этом обратная цепь отмечена фигурной скобкой. Мотивы PAM обоих онРНК подчеркнуты пунктирной линией. Вокруг целевого сайта модификации не были идентифицированы.

Создание моделей NANOS2-дефицитных свиней.

Кандидатные CRISPR онРНК и мРНК Cas9:GFP вводили в оплодотворенные *in vitro* свиные эмбрионы (фиг. 9С). Кратко, созревающие ооциты свиней были приобретены в ART Inc. (Madison, WI) и отправлены в лабораторию в течение ночи в коммерческой среде для созревания #1. Через 24 ч после помещения в среду для созревания #1 (предоставленную ART), 50-75 кумулюс-ооцитарных комплексов (СОС) помещали в 500 мкл среды для культуры ткани 199 (TCM 199), содержащей 0,14% ПВС, 10 нг/мл эпидермального фактора роста, 0,57 мМ цистеина, 0,5 МЕ/мл свиного ФСГ и 0,5 МЕ/мл овечьего ЛГ, и культивировали в течение еще 20 ч при 38,5°C и 5% CO₂ в воздухе при 100% влажности. Комплексы СОС встряхивали на вортексе в 0,1% гиалуронидазы в HEPES-буферной среде, содержащей 0,01% ПВС, в течение 4 мин для удаления кумулюсных клеток после созревания. Группы из 30-35 зрелых, денудированных ооцитов помещали в 100 мкл модифицированной Трис-буферной среды (mTBM) и оплодотворяли согласно установленному протоколу при использовании свежеполученной разбавленной спермы хряка. Коротко, 1-2 мл разбавленной спермы смешивали с фосфатно-солевым буферным раствором Дюльбекко (DPBS), содержащим 1 мг/мл BSA, до конечного объема 10 мл и центрифугировали при 1000 \times g, 25°C в течение 4 мин. Сперматозоиды промывали в DPBS в общей сложности три раза. После последней

промывки сперматозоиды ресуспендировали в среде mTBM и добавляли к ооцитам в конечной концентрации 5×10^5 сперматозоидов/мл, и совместно инкубировали в течение 5 ч при $38,5^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . Через 5 ч после оплодотворения в предполагаемые зиготы вводили мРНК Cas9 и онРНК против NANOS2 и интактные эмбрионы хирургически переносили в маточные трубы синхронизированных реципиентных самок животных, подвергая половые пути срединному разрезу. Животным позволяли восстановиться после операции и размещали в комплексе BARC-USDA.

Другая альтернатива состоит в применении *in vivo* оплодотворенных 1-клеточных эмбрионов для CRISPR-опосредованного таргетинга NANOS2 и создания отредактированных животных. Животных-доноров эмбрионов синхронизировали по периоду эструса и вызывали суперовуляцию сначала при введении с кормом Регумата (альтреногест) в течение 14-16 дней, затем делали подкожные инъекции PG600 (5 мл) в день 17 и 1000 МЕ ХГЧ в день 20. Животных спаривали трижды, один раз в период эструса (день 20) и еще два осеменения проводили с интервалом 8 ч в день 21. Животных гуманно забивали в день 22 и отбирали эмбрионы путем промывания маточной трубы. В эмбрионы вводили мРНК CRISPR и хирургически переносили их синхронизированным реципиентным (или суррогатным) животным в тот же день, как описано выше.

Пример 4.

Скрининг и размножение животных.

Скрининг животных.

Живорожденных животных после переноса отредактированных эмбрионов генотипируют следующим образом. Забирают образцы ткани (например, волосяной фолликул, ушные высечки, срезы кончика хвоста, кровь) и выделяют ДНК. Ген NANOS2 амплифицируют, используя подходящие праймеры, и секвенируют. Животных характеризуют как неотредактированных, гетерозиготных отредактированных или гомозиготных отредактированных.

Фертильность гомозиготных NANOS2-отредактированных самок.

Гомозиготных NANOS2-отредактированных самок контролируют на наступление половой зрелости и способность к овуляции с образованием фертильных ооцитов. Ооциты исследуют на способность давать бластоцисты после оплодотворения *in vitro*. Образцы гомозиготных NANOS2-отредактированных самок подвергают гемивариозектомии и исследуют яичник на предмет нормального оогенеза. Самок также подвергают спариванию и контролируют наступление беременности. В конечном счете фертильность гомозиготных NANOS2-отредактированных самок определяют по способности давать живое, здоровое потомство. Ожидается, что гомозиготные NANOS2-отредактированные самки будут обладать нормальной фертильностью.

Структура и функция семенников у гетерозиготных и гомозиготных NANOS2-отредактированных самцов.

У гетерозиготных и гомозиготных NANOS2-отредактированных самцов контролируют рост и размеры семенников. Ожидается, что гетерозиготные самцы будут иметь нормальный рост и размеры семенников, тогда как гомозиготные самцы, как ожидают, будут демонстрировать замедленный рост семенников и малый размер семенников при наступлении половой зрелости, обусловленные нехваткой половых клеток. Образцы гетерозиготных и гомозиготных NANOS2-отредактированных самцов подвергают гемикастрации и проводят цитологическое исследование семенников. Ожидается, что гетерозиготные самцы продемонстрируют нормальную структуру семенников с семенными трубочками, заселенными клетками Сертоли и половыми клетками, тогда как гомозиготные самцы, как ожидают, будут иметь только морфологию клеток Сертоли и полное отсутствие половых клеток. Объем и состав спермы будут исследованы после надлежащего сбора спермы (например, искусственное влагалище, рука в перчатке, электроэякуляция). Ожидается, что гетерозиготные самцы будут иметь нормальный объем спермы и число сперматозоидов, тогда как гомозиготные самцы, как ожидают, покажут полное отсутствие сперматозоидов.

Трансплантация ССК в семенники гомозиготных NANOS2-отредактированных самцов.

ССК собирают и размножают от подходящих доноров, например свиней Дюрок, и вводят ССК в семенниковую сеть гомозиготных NANOS2-отредактированных самцов-реципиентов, например, помеси пород крупной белой хландрас разного возраста. При половом созревании или по меньшей мере через 3 месяца после трансплантации ССК сперму собирают и исследуют на наличие сперматозоидов. Если сперматозоиды присутствуют, то определяют концентрацию, морфологию и подвижность сперматозоидов. Также определяют, что присутствующие сперматозоиды происходят из донорных ССК, а не от реципиента, например, при обнаружении характерных для породы Дюрок снипов в гене MC1R для образца свиньи. Определяют оптимальный реципиентный возраст свиней-реципиентов для максимальной продукции сперматозоидов, которая должна коррелировать с эффективностью ССК колонизации семенника реципиента.

Скрещивание с целью получения гомозиготных NANOS2-отредактированных самцов в качестве реципиентов ССК.

Партия гомозиготных NANOS2-отредактированных самцов может быть получена при скрещивании гомозиготных NANOS2-отредактированных самок с гетерозиготными отредактированными самцами. Скрещивание дает равные количества гомозиготных и гетерозиготных отредактированных самцов и самок. Го-

мозиготные редактированные самцы будут применяться как реципиенты ССК, гомозиготные самки и гетерозиготные самцы будут применяться в качестве племенных животных для замены с целью получения других гомозиготных NANOS2-редактированных самцов в качестве реципиентов ССК, а гетерозиготных самок будут отбраковывать.

Пример 5.

Создание NANOS2-редактированных животных путем инъекций в эмбрионы.

Кандидатную химерную онПНК, направленную против Экзона 1 NANOS2 свиньи, создавали с помощью общедоступной программы, разработанной д-ром Feng Zhang в Массачусетском технологическом институте (crispr.mit.edu). Направляющая ПНК, используемая в исследованиях инъекций в эмбрионы, являлась следующей: GATCAGTCCCAACACCACCTGG (SEQ ID NO: 160). Последовательность CRISPR направляющей ПНК (SEQ ID NO: 160) и последовательность-мишень CRISPR (SEQ ID NO: 161) в ORF NANOS2 (SEQ ID NO: 1 и 2) показаны на фиг. 13.

Кандидатную CRISPR онПНК и мПНК Cas9:GFP транскрибировали *in vitro* при использовании набора T7 mMessage Machine (Ambion), очищали при использовании набора Megaclear (Ambion) и вводили в оплодотворенные *in vivo* свиные 1-клеточные эмбрионы. Группу из 12 животных возрастом 8-9 месяцев синхронизировали по периоду эструса и использовали в эксперименте. Восемь из синхронизированных животных скрещивали для использования в качестве доноров эмбрионов, тогда как остальных 4 животных синхронизировали (но не скрещивали) и использовали в качестве суррогатных особей. Эструс синхронизировали, вводя с кормом 5 мл аналога прогестерона, Регумата (или Matrix), в течение 14 дней. Через 24 ч после последнего приема Регумата с кормом животным подкожно вводили дозу PMSG (1200 ME, Sigma) и через 72 ч вызывали овуляцию подкожным введением ХГЧ (1000 ME, Chogulon, Merck). Донорных животных (n=8) с активной течкой искусственно осеменяли спермой хряка (предоставленной PIC Genetics). Эмбрионы *in vivo* от донорных животных забирали хирургически через 24 ч после ИО ретроградным смывом стерильной средой TL-Hepes с ПВС из маточной трубы. В полученные *in vivo* эмбрионы затем вводили мПНК Cas9:GFP и онПНК, направленной против NANOS2, и культивировали в среде PZM3⁵⁸ в течение ночи. Через день после микроинъекции 30 эмбрионов хирургически переносили в маточные трубы каждого суррогатного животного.

Для переноса эмбрионов донорным и суррогатным свиньям делали анестезии смесью кетамина/ксилазина (6,6 и 1-2 мг/кг, в/м) и помещали на спину на хирургический стол. Требуемую глубину анестезии оценивали при мониторинге частоты сердечных сокращений, температуры, частоты дыхания, сужения зрачка и сниженного или отсутствующего пальцебрального рефлекса. Половые пути свинок под наркозом обнажали через разрез брюшной стенки по средней линии. Были открыты только маточные трубы и вершины матки. У доноров эмбрионы ретроградно смывали через маточно-трубное соединение и собирали эмбрионы у устья маточной трубы. Для переноса эмбрионов суррогатным животным катетер tom-cat, содержащий эмбрионы, помещали через воронку трубы и вносили эмбрионы в маточную трубу. После трехслойного ушивания разреза при использовании рассасывающейся нити (USP #3 стенка тела, #3 жировой слой, #1 п/к) животным позволяли восстановиться. Беременность подтверждали по отсутствию возобновления эструса (21 день) и по УЗИ через 28 дней после переноса эмбрионов. Исследование с первым выполненным переносом эмбрионов привело к наступлению беременности у 3 из 4 суррогатных животных и рождению 18 редактированных поросят (фиг. 14). Все 18 поросят показали моно- или биаллельные модификации NANOS2, указывая на очень высокую эффективность данного метода.

Пример 6.

Создание NANOS2-редактированных животных с помощью переноса ядра соматической клетки (SCNT).

Культуру свиных фетальных фибробластов (СФФ) создавали из плодов, выделенных у беременных свиной D35 породы Дюрок. Линию СФФ кандидатных самцов и самок подвергали нуклеофекции плазмидой Cas9:GFP под контролем промотора CMV (Addgene) и ПЦП-фрагментом, состоящим из одиночной направляющей ПНК против NANOS2 под контролем промотора hU6 (SEQ ID NO: 162). Через один день после нуклеофекции, нуклеофицированные клетки сортировали по одной в каждую лунку 96-луночного планшета. Клетки питали обработанной облучением кондиционированной питательной средой для фибробластов и позволяли образовать колонии. Через неделю культивирования колонии начинали появляться в лунках. Клетки размножали клонально, выделяли ДНК и проводили скрининг на мутации при помощи секвенирования ДНК. Клетки, гомозиготны нулевые по NANOS2, клонировали путем переноса ядер соматических клеток с получением NANOS2 нулевых поросят женского и мужского пола. В результате этих попыток SCNT получили одного выжившего самца и трех самок поросят (см. фиг. 15).

Пример 7.

Тестикулярный фенотип NANOS-2 редактированных животных.

В возрасте 3 месяцев у двух поросят с биаллельным гомозиготным нокаутом NANOS2 проводили биопсию и морфологическое исследование семенников. По результатам наблюдений срезов биоптата с помощью световой микроскопии (фиг. 16) семенные шнуры интактные и присутствуют соматические поддерживающие клетки. Хотя некоторые половые клетки все еще присутствуют у гомозиготных нокаутных животных, их количество, по-видимому, существенно уменьшено по сравнению с обычно наблю-

даемым у животного дикого типа в этом возрасте. Действительно, некоторые из шнуров у гомозиготных животных, по-видимому, лишены половых клеток. Кроме того, ядра оставшихся половых клеток у гомозиготных животных, судя по всему, были пикнотичными, что указывает на апоптоз. В возрасте 3 месяцев семенные шнуры у свиней дикого типа обычно содержат множественные слои развивающихся половых клеток, что является показателем активного сперматогенеза. Ни один из шнуров у NANOS2 нокаутного животного не содержит множественные слои половых клеток, что убедительно указывает на отсутствие эндогенной зародышевой линии. В совокупности данные наблюдения указывают, что фенотип с потерей функции NANOS2 сохранялся у животных, включая потерю мужской зародышевой линии на раннем этапе развития, приводящую к фенотипу только с клетками Сертоли. Исследования на мышах продемонстрировали, что самцы с таким фенотипом являются превосходными реципиентами для регенерации донорской зародышевой линии после трансплантации сперматогониев.

Пример 8.

Трансплантации с NANOS2 гомозиготными нокаутными реципиентами.

В возрасте 4 месяцев двух гомозиготных нокаутных поросят подвергали трансплантации сперматогониев, выделенных из семенников самца поросенка-донора породы Дюрок, возрастом 21 день. Коротко, донорские клетки суспендировали в объемах 1 мл среды для инъекции до плотности $1,4 \times 10^6$ клеток/мл и 600-900 мкл объема вводили в семенные трубочки с контролем по УЗИ в сеть семенника. В один семенник каждого животного пересаживали донорские клетки, и контралатеральный семенник оставляли в качестве контроля без инъекции.

Пример 9.

Гены NANOS

NANOS1 *Sus scrofa*

SEQ ID NO:6

```
MEAFFWAPRSPRRGRVPPPMALVPSARYVSAQGAHPQPFSSWNDYLGATLITKAVDGEPRFG
CARGEDGGGGGSPSSSSSSCCSPHAGAGPGALGPALGPPDYDEDDDDSDPEGSRGRYLGGT
LELRALCADCADPSEAGLLEERFAELSPFAGRATAVLLGWAPATAATAEAAAPREERAPAWAAEPR
LHAAFGAAGARLLKPELQVCVFCRNKAEVALYTTTHILKGPDRVLCPLVRRYTCLPGASGDN
AHTIKYCPLSKVPPRSPRVDGLPGKCLR
```

SEQ ID NO:5 начало

```
1  cgcagggggc  agggccgcgc  cagcagggcc  ggggggcggg  gaggagcggg
gcccgataaa
61  aggcagcgag  gcggccccac  cccgctgcag  gccggcgggc  aggctcgggc
cgtcctttcc
121  gtccggcccg  ccccggcggc  ggggagggcg  cgcgcgcggc  ccgagcccg
cccatggagg
181  ctttcccctg  ggcgccccgc  tcgccccgcc  gcggcccgct  cccccgccc
atggcgctcg
241  tgcccagcgc  ccgctacgtg  agcgcaccag  gcccggcgca  cccgcaacc
ttcagctcgt
301  ggaacgacta  cctgggactc  gccacgctca  tcaccaaggc  ggtggagcgc
gagccgcgct
361  ttggctgcgc  ccgcggcgag  gacggcggcg  gcggcggcgg  ctccccacc
tcctcttctc
421  cctcgtcgtg  ctgctcccc  caccgggggg  ccgggcctgg  ggcgctggg
cccgcgctgg
481  ggccaccgca  ctacgacgag  gacgacgacg  acgacagcga  cgagccggg
tcccggggcc
541  gctacctggg  gggcacgctg  gagctgcgcg  cgctggagct  gtgcgcggac
ccctcggagg
601  ccgggctgct  ggagagcgc  ttgcgcgagc  tgagcccgtt  cgcgggtcgc
gccaccgctg
661  tgctgctggg  ctgggcaccc  gccactgccg  ccaccgcca  ggcgccacc
cgcgagggagc
721  gggccccggc  gtggcgggcc  gagccccggc  tgcacgcagc  ctttggggcg
gccggcggcc
781  ggctgctcaa  gcccgagctg  caggtgtgtg  tgttttgccg  gaacaacaag
```

gaggcggtgg
 841 cgctctacac caccacatc ttgaaggac cgcacggcg agtgctgtgc
 ccggtgctgc
 901 gccgctacac gtgtcccctg tgcggcgcca gggcgacaa cgcgcacacc
 atcaagtact
 961 gcccgctctc caaagtgccg ccgcccgcga gcgtcagga cggcctgccc
 ggcaagaagc
 1021 tgcgctgagg gcccgactc cggctctgta ctgccacctg acgccaccag
 ggtcgccgcc
 1081 tgcccaatgt ctagtttggc ctgcgcacca tctctctctc tcgctgctga
 ggagcgtgga
 1141 gctcagctgt tggttgaact tgagatgtac tgatTTTTTT tTTTTTTTT
 tcaaaagaac
 1201 ccggcggtac tgagtccttt cctgtcgaag agcgcttaag actagaagct
 aaaatcttga
 1261 ttgttttato tctagtttgt gcacatccag acggtgaagg ctgggtgttc
 gttccactaa
 1321 ctgaaatgtg gcaacttaga agtgtttatt tactctatac gtcaacctat
 tttagatgcg
 1381 catcagtata tgaattgtc tcaatctaata cttggatggt taatTTTatg
 aatggaggca
 1441 ctttactagg cctagaatat ttttttaaaa gcctctaaac tgaactaac
 tggcgatttt
 1501 atggaatgtc agcaaatga cttttattgt ttgaaacaag taataatatt
 tctgttgtcc
 1561 ttaatcagtt attctaattc caggtgaagc aaccctcacc tgctggtag
 catcattaag
 1621 tgaaggctta gtaaactttc cagtgttagt ttgggtgggt gttccccccg
 tggcttgttt
 1681 ctgtcctagc tggaggtgta aagatgtaca atctgtggca ggtagaatac
 agctccttat
 1741 ccttttatgt accacatctt ttattactga acgagcaact agcgtttccc
 atctttcaaa
 1801 gtcgtgccag gttatataat attgtgtata cacttgaaa tgggtgctgtt
 taaaagaatt
 1861 tgtgtattta tacagtaaca gtatatgaat tcattaatct tgtctt

NANOS2 *Sus Scrofa*

SEQ ID NO:2

MQLPFFDMWKDYFNLSQVVLGLIQNRRQGPEAPGTGEPRPEPPLEQDQGPGERGASGGLA
TLCNFCKHNGESRHVYSSHQLKTPEGVVVCPILRHVVCPLCGATGDQAHTLKYCPLNGGQQSLY
RRSGRNSAGRKVKR

SEQ ID NO:1 (сайт-мишень CRISPR подчеркнут)

1 atgcagctgc cacccttga catgtggaag gactacttca acctgagcca
ggtggtgttg
61 ggactgatcc agaatcgtcg acaagggcca gaggccccgg gcaccgggga
gccaagacct
121 gagccccac tggagcagga ccagggcccg ggagagcggg gggccagcgg
gggctggcc
181 accctgtgca acttttgcaa acacaatggg gaatctcgcc acgtgtactc
ctcgcaccag
241 ctgaagacac cggagggcgt ggtggtgtgt cccatcctac gacactatgt
gtgtcccctg
301 tgcggggcca ccggtgacca ggctcacaca ctcaagtact gcccgtcaa
cggcggccag
361 cagtctctct atcgccgag tgggcgcaat tcagccggcc gcaaggtcaa
gcgctga

NANOS3 *Sus scrofa*

SEQ ID NO:4

MHSFGRCIFGAAAAPPVTIRNLPQPAPPSSHPLGGIRRELTQTPGLQREKGRGRKGI
EGRSLGWLGFSSALSALSPGTLCPAMGTENLWTDYLGGLARLVGALRGEETRLDPQPAPVPGP
EGQRFPSESSPAPERLCSFCKHNGESRAIYQSHVLKDEAGRVLCPILRDYVCPQCGATRERAHT
RRFCPLTSQGYTSVYSYTRNSAGKKLARPDKARTQDSGHRGGGGGGASTGSKGAGKSSGTSP
SPCCPSTSA

SEQ ID NO:3

1 cagccacc caggaccatg cattcctttg gcagtgcat ttttgaggga
gcagcagcaa
61 gccccctgt gacaataagg aacctccac agcctgctcc tccctcttca
cacccttg
121 gaggtataag gagggaactg acagcccaga ctctgggct ccagagagag
aaagggaggg
181 gcagggggaa ggggatagaa ggacgatctt tggggtggct gggtttcttc
tctctctctg

241 ccctttcacc tggtaactt tgcccagcca tggggacctt caacctgtgg
 acagattacc
 301 tgggtttggc acgctgttg ggggctctgc gtggggaaga ggaacctgag
 acgaggctgg
 361 acccccagcc agcaccagtg ccaggaccag agggtcagag gccagcccc
 gaatcctcac
 421 cagctcctga acgctgtgc tctttctgca aacataatgg cgaatccccg
 gccatctacc
 481 agtcccacgt gctcaaggat gaagcgggcc gagttctgtg cccattctt
 cgagactacg
 541 tgtgccccca gtgcggtgcc acacgcgagc gtgccatac ccgccgcttc
 tgccctctca
 601 ccagccaggg ctacacctt gtctacagct acaccaccg caactcggcc
 ggcaagaagc
 661 tggcccggcc ggacaaggcg aggacacag actctggaca tcggcgagga
 ggaggaggag
 721 gaggtgccag cacaggttcc aaagggtccg ggaagtcttc tggaacttct
 ccgtctccct
 781 gctgtccctc cacttctgcc taagaggctg gcgagagcag gacggagatg
 ctgccttcac
 841 ctggggatgg ggaccaggc tcagtggagg ctgggtttca gggacgacct
 acccttcgcg
 901 gatccgcccc tgccccagc ctgggagccc tgcaaggag ccaggcctgg
 aagctcggcc
 961 aaaagagagc cgctccttc tccccatctc ccacccaag aaaggaggtg
 gtcctctggc
 1021 aacctgccc tccttcccc a gcgctgggca cccagttagc actcaataaa
 tac

Бычий NANOS2 NM_001281904

SEQ ID NO:10

MQLPPFDMWKDYFNLSQVVLALIQSRGQLETQGTGEPRPGPHVEQDQGQGRGAGGGLA
 TLCNFCKHNGESRHVYSSHQLKTPEGVVVCPILRHVVCPLCGATGDQAHTLKYCPLNGGQQSLY
 RRSGRNSAGRKVKR

SEQ ID NO:9

1 tcagctgctc ctgtctgagg gccccagcc cacttctctc cagccacca
 ccaccaacac

61 tccccgggt gccatgcagc tgccaccctt tgacatgtgg aaggactact
tcaacctgag

121 ccaagtgggt ctggcactga tccagagtcg ggggcaaggg ttggagacc
aagggactgg

181 ggagccgaga cccgggcccc atgtggagca ggatcagggg cagggcggac
gcggggctgg

241 cgggggcctg gccaccctgt gcaacttttg caaacacaat ggagagtctc
gccacgtgta

301 ctctcacac cagctgaaga ccccgagggg cgtggtggtg tgtccattc
tgcgccatta

361 tgtatgtccc ctgtgcgggg ccaccgggga ccaggccac aactcaagt
actgcccact

421 caacggagga cagcagtctc tctaccgccc cagtgggggc aactcagccc
gccgcaaggt

481 caagcgtga agaccgtcag gtaccacccc gctgcagccc caacctccc
tggttcagcc

541 ctcccaag

NANOS 1 бычий

XM_005225796

SEQ ID NO:12

AAAAATAEAAAPREERAPAWAAEPKLHAASGAAAARLLKPELQVCVFCRNNKEAVALYTT
ILKGPDGRVLCPLRRYTCPLCGASGDNAHTIKYCPLSKVPPPPAARPPRSARDGLPGKKLR

SEQ ID NO:11

1 gccgcccgcg cggccaccgc cgaagcagca ccgcgagagg agcgggcccc
ggcgtggggc

61 gccgagccca agctgcacgc cgcctccggg gcggccgccc cccggtgct
caagcccag

121 ctgcaggtgt gcgtgttttg ccggaacaac aaggaggcgg tggcgtctc
caccaccac

181 atcctgaagg gacccgacgg gcgggtgctg tgcccctgc tgcgcccgtc
cacgtgtccc

241 ctgtgcgggt ccagcggcga caacgcgcac accatcaagt actgcccgt
ttccaaagtg

301 ccgcccgcgc ctgcagcccg cccgcccgcg cgcagcgcgc gggacggcct
gcccggcaag

361 aagctgcgct aaggggcccg accccggtct gctgctgcca cctgatgcca

ctgggtagc
 421 cgcccgccca ctctcgtggt tggctctgcgc accatctctt cctcgtgccc
 ggggagtgtg
 481 gagctcgtct tggtttttcc agaggaagcc gacggtaccg agtattttcc
 taacgaagag
 541 cagttgagac tagacgttaa aatthtgatt aatgthtcta gthtgthcac
 atccagatgg
 601 tgaaggctgg gtattccact aactgaaatg tggcaactta gaggcgctgt
 ggtttattta
 661 tacgtcgacc tattthtagat gcgcatcagt atgaaattgt ctcagthcaa
 tcttgatgt
 721 ttaattthtat gaatggagcc actthtactag gtctagaata thttthttaa
 agcctctcaa
 781 ctgaactthaa aactggcgat thtatggagt gtcagcaaaa tgactattth
 attgtctgaa
 841 acaatattthc tgttgthcctt acccagthgt aattccaggt gaagccctgc
 gtggtagcat
 901 cattaagtga agactthgta tgcthtacag tgttagthtg ggtggthgtt
 cctcctthgt
 961 ggctthgttht tgtcctagct ggagatgtat aaaatgtaca atthtgaggt
 agcagthtaga
 1021 atacagthca tgtaccagat cththtatta ctgaacgagc aactactacc
 gththtcccc
 1081 thtaaaaata gtgccaagtht ataatcatat tgtgtataca cthgaaaatg
 gtgctgthta
 1141 aaaaaattgt gtattthatac agthaacagta tatgaattca thaacctthgc
 cthtaactct
 1201 actthgcttht thctthtatgc cctthcctat thcagthtctt caaaaatag
 tgatactthaa
 1261 gatcaaacgg gtgcaataac thattcactc tgaattgctc cattccaggg
 thctthaaata
 1321 gtggaaatct cattccagct gthgctctc agactaaatg taagatggaa
 thctthtgagc
 1381 thtggaaggt thaatgaaaca actggtgthc aggaagthc cactctggac
 tgtgthcagct
 1441 thaaaccatc acagaagthc thaaaccagtht ataagthacca attthaaaggaa

ctgactgggt
 1501 gtagggggg taacacaagg aacacagcct ccatctattg tgttcccatt
 ct cattagaa
 1561 gacaaccctt ctggaatccc accagttatt ttcacgggtg agattaaatc
 taatcttggg
 1621 caaa
 BOVINE NANOS1 (ALT)
 XM_001787922
 SEQ ID NO:14
 RYVSTQGPAPHPQPFSSWNDYLGLATLITKAVDGEPRFGCARGGDGGDGSPPSSSSSSCC
 SPHVGAGPGALGPALGPPDYDEDDDDSDDPGSRSRYLGGALELRALELCADPAEAGLLEERF
 AELSPFAGRAAAVLLGCAPAAAAATAEAAAPREERAPAWAAEPKLHAASGAAAARLLKPELQVC
 VFCRNKEAVALYTHILKGPDGRVLCPLVRRYTCPLCGASGDNAHTIKYCPLSKVPPPPAARP
 PPRSARDGLPGKKLR
 SEQ ID NO:13
 1 cgctacgtga gcaccaggg cccggcgac ccgcagccct tcagctcgtg
 gaacgactat
 61 ctgggactcg ccacgctcat caccaaggcg gtggacggcg agcccgctt
 cggtgcgcc
 121 cgcggcgggg acggcgggcg ggacggtcc ccgccttctt cttcctcctc
 gtctgtctgc
 181 tccccccacg tgggggcccg gctggggcg ctggggcccg cgctggggcc
 gcccgactac
 241 gacgaggacg acgacgacga cgacagcgac gatccggggt cccggagccg
 ctacctgggg
 301 ggcgcgctgg agctgcgcgc gctggagctg tgcgcggacc ctgccgaggc
 cgggctgctg
 361 gaggagcgtt tcgctgagct gagcccgttc gctggtcgcg ccgctgccc
 gcttctgggc
 421 tgcgcacccg ccgccccgc cgcggccacc gccgaagcag caccgcgaga
 ggagcgggccc
 481 ccggcgtggg cggccgagcc caagctgcac gccgcctccg gggcgccgc
 cgcgccgctg
 541 ctcaagcccg agctgcaggt gtgcgtgttt tgccggaaca acaaggaggc
 ggtggcgctc
 601 tacaccacc acatcctgaa gggacccgac gggcggtgc tgtgcccctg

gctgcccgg
 661 tacacgtgtc ccctgtgagg tgccagcggc gacaacgcgc acaccatcaa
 gtactgcccg
 721 ctttccaaag tgccgccgcc gcctgcagcc cgcgccgcgc cgcgcagcgc
 ccgggacggc
 781 ctgcccggca agaagctgag ctaagggccc ggaccccgtt ctgctgctgc
 cacctgatgc
 841 cactggggta gccgccgcc cactctctgt tttggtctgc gcaccatctc
 ttctctctgc
 901 ccggggagtg tggagctcgt cttggttttt ccagaggaag ccgacggtac
 cgagtatttt
 961 cctaacgaag agcagttgag actagacgtt aaaattttga ttaatgtttc
 tagtttctgc
 1021 acatccagat ggtgaaggct gggatttcca ctaactgaaa tgtggcaact
 tagaggcgtt
 1081 gtggtttatt tatacgtcga cctatttttag atgcgcacca gtatgaaatt
 gtctcagtct
 1141 aatcttgat gtttaatttt atgaatggag gcactttact aggtctagaa
 tattttttta
 1201 aaagcctctc aactgaactt aaaactggcg attttatgga gtgtcagcaa
 aatgactatt
 1261 ttattgtctg aaacaatatt tctgttctcc ttaccagtt gtaattccag
 gtgaagccct
 1321 gctggtagc atcattaagt gaagacttgg tatgctttac agtgttagtt
 tgggtgggtg
 1381 ttccctcctt gtggcttgtt tttgtcctag ctggagatgt ataaaaatgta
 caattttag
 1441 gtagcaggta gaatacagct catgtaccag atctttttat tactgaacga
 gcaactacta
 1501 ccgtttttcc cctttaaaaa tagtgccaag ttataatcat attgtgtata
 cacttgaaaa
 1561 tgggtctggt taaaaaaatt gtgtatttat acagtaacag tatatgaatt
 cattaacctt
 1621 gcctttaact ctacttggct ttttctttat gcccttccct attccagttc
 ttcaaaaata
 1681 tgtgatactt aagatcaaac gggtgcaata actcattcac tctgaattgc
 tccatttcag
 1741 ggtctctaaa tagtggaat ctcattccag ctgttgctc tcagactaaa
 tgtaagatgg
 1801 aatcctttga gctctggaag gttaatgaaa caactggtgt tcaggaaggt
 tccactctgg
 1861 actgtgtcag ctttaaacca tcacagaagt cctcaaacca gtataagtac
 caattaaagg
 1921 aactgactgg gtgtaggggg ggtaacacaa ggaacacagc ctccatctat
 tgggttcca
 1981 ttctcattag aagacaacc ttctggaatc ccaccagtta ttttcatcgg
 tgagattaaa
 2041 tctaactctg ggcaaa

Все источники, цитируемые в настоящем описании, полностью включены в настоящую заявку посредством отсылки. Примеры, раскрытые в настоящей заявке, представлены в качестве иллюстрации и не должны ограничивать объем изобретения.

Таблица последовательностей

SEQ	ТИП	ОПИСАНИЕ
SEQ ID NO:1	нуклеотид	sus scrofa NANOS2
SEQ ID NO:2	белок	Sus scrofa NANOS2
SEQ ID NO:3	нуклеотид	sus scrofa NANOS3
SEQ ID NO:4	белок	Sus scrofa NANOS3
SEQ ID NO:5	нуклеотид	sus scrofa NANOS1
SEQ ID NO:6	белок	Sus scrofa NANOS1
SEQ ID NO:7	нуклеотид	2 ^о онРНК Фигура 10
SEQ ID NO:8	нуклеотид	онРНК Фигура 10
SEQ ID NO:9	нуклеотид	Бычий NANOS2
SEQ ID NO:10	белок	Бычий NANOS2
SEQ ID NO:11	нуклеотид	Бычий NANOS3
SEQ ID NO:12	белок	Бычий NANOS3
SEQ ID NO:13	нуклеотид	Бычий NANOS3 (alt)
SEQ ID NO:14	белок	Бычий NANOS3 (alt)
SEQ ID NO:15	нуклеотид	Фигура 3А последовательность и скелет под контролем промотора U6
SEQ ID NO:16	нуклеотид	Фигура 3В последовательность и скелет под контролем промотора U6
SEQ ID NO:17	нуклеотид	Фигура 3С CRISPR конструкция
SEQ ID NO:18	нуклеотид	Фигура 3 С U6
SEQ ID NO:19	нуклеотид	Фигура 3 С мишень
SEQ ID NO:20	нуклеотид	Фигура 3С скелет нРНК
SEQ ID NO:21	нуклеотид	Фигура 3С концевой
SEQ ID NO:22	нуклеотид	Фигура 5В PX458
SEQ ID NO:23	нуклеотид	Фигура 5В hu6
SEQ ID NO:24	нуклеотид	Фигура 5В скелет нРНК
SEQ ID NO:25	нуклеотид	Фигура 5В концевой
SEQ ID NO:26	нуклеотид	NANOS Фигура 10А
SEQ ID NO:27	нуклеотид	NN6-1 Фигура 10А
SEQ ID NO:28	нуклеотид	NN7-1 и NN7-2 Фигура 10А
SEQ ID NO:29	нуклеотид	NANOS Фигура 9D
SEQ ID NO:30	нуклеотид	N1-1 Фигура 9D
SEQ ID NO:31	нуклеотид	N1-2 Фигура 9D
SEQ ID NO:32	нуклеотид	N3-2 Фигура 9D
SEQ ID NO:33	нуклеотид	N3-3 Фигура 9D
SEQ ID NO:34	нуклеотид	N5-2 Фигура 9D
SEQ ID NO:35	нуклеотид	N5-3 Фигура 9D
SEQ ID NO:36	нуклеотид	N6-1 Фигура 9D
SEQ ID NO:37	нуклеотид	N7-2 Фигура 9D
SEQ ID NO:38	нуклеотид	N7-3 Фигура 9D
SEQ ID NO:39	нуклеотид	N10-2 Фигура 9D
SEQ ID NO:40	нуклеотид	N11-2 Фигура 9D
SEQ ID NO:41	нуклеотид	N12-2 Фигура 9D
SEQ ID NO:42	нуклеотид	N12-3 Фигура 9D
SEQ ID NO:43	нуклеотид	Фигура 5С PX458
SEQ ID NO:44	нуклеотид	NANOS2 Фигура 10В
SEQ ID NO:45	нуклеотид	N3-1-3 Фигура 10В
SEQ ID NO:46	нуклеотид	N3-2-3 Фигура 10В

SEQ	ТИП	ОПИСАНИЕ
SEQ ID NO:47	нуклеотид	N3-6-2 Фигура 10B
SEQ ID NO:48	нуклеотид	N3-7-3 Фигура 10B
SEQ ID NO:49	нуклеотид	N3-8-3 Фигура 10B
SEQ ID NO:50	нуклеотид	N3-10-2 Фигура 10B
SEQ ID NO:51	нуклеотид	N-3-12-2 Фигура 10B
SEQ ID NO:52	нуклеотид	N3-12-3 Фигура 10B
SEQ ID NO:53	нуклеотид	Фигура 11 онРНК1
SEQ ID NO:54	нуклеотид	Фигура 11 онРНК2
SEQ ID NO:55	нуклеотид	Фигура 11 NANOS
SEQ ID NO:56	нуклеотид	Фигура 11 N2-3
SEQ ID NO:57	нуклеотид	Фигура 11 N3-1
SEQ ID NO:58	нуклеотид	Фигура 11 N4-2
SEQ ID NO:59	нуклеотид	Фигура 11 N5-2
SEQ ID NO:60	нуклеотид	Фигура 11 N6-3
SEQ ID NO:61	нуклеотид	Фигура 11 N7-1
SEQ ID NO:62	нуклеотид	Фигура 12 nt
SEQ ID NO:63	amino acid	Фигура 12 NANOS CDS
SEQ ID NO:64	нуклеотид	Фигура 12 oSL86
SEQ ID NO:65	нуклеотид	Фигура 12 pSL36 или 37
SEQ ID NO:66	нуклеотид	Фигура 12 pSL34 или 35
SEQ ID NO:67	нуклеотид	Фигура 12 pSL32 или 33
SEQ ID NO:68	нуклеотид	Фигура 12 pSL38 или 39
SEQ ID NO:69	нуклеотид	Фигура 12 pSL39 или 40
SEQ ID NO:70	нуклеотид	Фигура 12 pSL41 или 42
SEQ ID NO:71	нуклеотид	Фигура 12 pSL43 или 44
SEQ ID NO:72	нуклеотид	Фигура 12 pSL45 или 46
SEQ IN NO:73	нуклеотид	Фигура 12 pSL47 или 48
SEQ ID NO:74	нуклеотид	Фигура 12 oSL87
SEQ ID NO:75	нуклеотид	18:18:18 TALEN
SEQ ID NO:76	нуклеотид	TALEN праймер 1

SEQ	ТИП	ОПИСАНИЕ
SEQ ID NO:77	нуклеотид	TALEN праймер 2
SEQ ID NO:78	нуклеотид	18:16:18 TALEN
SEQ ID NO:79	нуклеотид	TALEN праймер 3
SEQ ID NO:80	нуклеотид	TALEN праймер 4
SEQ ID NO:81	нуклеотид	18:17:18 TALEN
SEQ ID NO:82	нуклеотид	TALEN праймер 5
SEQ ID NO:83	нуклеотид	TALEN праймер 6
SEQ ID NO:84	нуклеотид	oSL9
SEQ ID NO:85	нуклеотид	oSL10
SEQ ID NO:86	нуклеотид	CRISPR мишень
SEQ ID NO:87	нуклеотид	CRISPR мишень
SEQ ID NO:88	нуклеотид	oSL48
SEQ ID NO:89	нуклеотид	oSL49
SEQ ID NO:90	нуклеотид	oSL50
SEQ ID NO:91	нуклеотид	oSL51
SEQ ID NO:92	нуклеотид	oSL52
SEQ ID NO:93	нуклеотид	oSL53
SEQ ID NO:94	нуклеотид	oSL54
SEQ ID NO:95	нуклеотид	oSL55
SEQ ID NO:96	нуклеотид	oSL56
SEQ ID NO:97	нуклеотид	oSL57
SEQ ID NO:98	нуклеотид	oSL58
SEQ ID NO:99	нуклеотид	oSL59
SEQ ID NO:100	нуклеотид	oSL60
SEQ ID NO:101	нуклеотид	oSL61
SEQ ID NO:102	нуклеотид	oSL62
SEQ ID NO:103	нуклеотид	oSL63
SEQ ID NO:104	нуклеотид	oSL64
SEQ ID NO:105	нуклеотид	oSL65
SEQ ID NO:106	нуклеотид	oSL66

SEQ	ТИП	ОПИСАНИЕ
SEQ ID NO:107	нуклеотид	oSL67
SEQ ID NO:108	нуклеотид	oSL68
SEQ ID NO:109	нуклеотид	oSL69
SEQ ID NO:110	нуклеотид	oSL70
SEQ ID NO:111	нуклеотид	oSL71
SEQ ID NO:112	нуклеотид	oSL72
SEQ ID NO:113	нуклеотид	oSL73
SEQ ID NO:114	нуклеотид	oSL74
SEQ ID NO:115	нуклеотид	oSL75
SEQ ID NO:116	нуклеотид	oSL76
SEQ ID NO:117	нуклеотид	pSL32 и pSL38: WT Фиг. 8a
SEQ ID NO:118	нуклеотид	pSL32 и pSL38 Клон 1 Фиг. 8a
SEQ ID NO:119	нуклеотид	pSL32 и pSL38 Клон 2 Фиг. 8a
SEQ ID NO:120	нуклеотид	pSL32 и pSL38 Клон 3 Фиг. 8a
SEQ ID NO:121	нуклеотид	pSL32 и pSL38 Клон 4 Фиг. 8a
SEQ ID NO:122	нуклеотид	pSL32 и pSL38 Клон 5 Фиг. 8a
SEQ ID NO:123	нуклеотид	pSL32 и pSL39: WT Фиг. 8b
SEQ ID NO:124	нуклеотид	pSL32 и pSL39: Клон 1 Фиг. 8b
SEQ ID NO:125	нуклеотид	pSL32 и pSL39: Клон 2 Фиг. 8b
SEQ ID NO:126	нуклеотид	pSL32 и pSL39: Клон 3 Фиг. 8b
SEQ ID NO:127	нуклеотид	pSL32 и pSL39: Клон 4 Фиг. 8b
SEQ ID NO:128	нуклеотид	pSL32 и pSL39: Клон 5 Фиг. 8b
SEQ ID NO:129	нуклеотид	pSL32 и pSL42 WT Фиг. 8c
SEQ ID NO:130	нуклеотид	pSL32 и pSL42 Клон 1 Фиг. 8c
SEQ ID NO:131	нуклеотид	pSL32 и pSL42 Клон 2 Фиг. 8c
SEQ ID NO:132	нуклеотид	pSL32 и pSL42 Клон 3 Фиг. 8c
SEQ ID NO:133	нуклеотид	pSL32 и pSL42 Клон 4 Фиг. 8c
SEQ ID NO:134	нуклеотид	pSL32 и pSL42 Клон 5 Фиг. 8c
SEQ ID NO:135	нуклеотид	pSL33 и pSL38 WT Фиг. 8d
SEQ ID NO:136	нуклеотид	pSL33 и pSL38 Клон 1 Фиг. 8d
SEQ ID NO:137	нуклеотид	pSL33 и pSL38 Клон 2 Фиг. 8d
SEQ ID NO:138	нуклеотид	pSL33 и pSL38 Клон 3 Фиг. 8d
SEQ ID NO:139	нуклеотид	pSL33 и pSL38 Клон 4 Фиг. 8d
SEQ ID NO:140	нуклеотид	pSL33 и pSL38 Клон 5 Фиг. 8d
SEQ ID NO:141	нуклеотид	pSL33 и pSL39 WT Фиг. 8e
SEQ ID NO:142	нуклеотид	pSL33 и pSL39 Клон 1 Фиг. 8e
SEQ ID NO:143	нуклеотид	pSL33 и pSL39 Клон 2 Фиг. 8e
SEQ ID NO:144	нуклеотид	pSL33 и pSL39 Клон 3 Фиг. 8e
SEQ ID NO:145	нуклеотид	pSL33 и pSL39 Клон 4 Фиг. 8e
SEQ ID NO:146	нуклеотид	pSL33 и pSL39 Клон 5 Фиг. 8e
SEQ ID NO:147	нуклеотид	pSL33 и pSL42 WT Фиг. 8f

SEQ	ТИП	ОПИСАНИЕ
SEQ ID NO:148	нуклеотид	pSL33 и pSL42 Клон 1 Фиг. 8f
SEQ ID NO:149	нуклеотид	pSL33 и pSL42 Клон 2 Фиг. 8f
SEQ ID NO:150	нуклеотид	pSL33 и pSL42 Клон 3 Фиг. 8f
SEQ ID NO:151	нуклеотид	pSL33 и pSL42 Клон 4 Фиг. 8f
SEQ ID NO:152	нуклеотид	pSL33 и pSL42 Клон 5 Фиг. 8f
SEQ ID NO:153	нуклеотид	oSL77
SEQ ID NO:154	нуклеотид	oSL78
SEQ ID NO:155	нуклеотид	oSL79
SEQ ID NO:156	нуклеотид	oSL80
SEQ ID NO:157	нуклеотид	oSL81
SEQ ID NO:158	нуклеотид	oSL82
SEQ ID NO:159	нуклеотид	oSL83
SEQ ID NO:160	нуклеотид	онРНК Фиг. 13А
SEQ ID NO:161	нуклеотид	CRISPR Мишень Фиг. 13В
SEQ ID NO:162	нуклеотид	онРНК Фиг. 15
SEQ ID NO:163	нуклеотид	NANOS2 WT Фиг. 14
SEQ ID NO:164	нуклеотид	NANOS2 свинья 1-1 Фиг.14
SEQ ID NO:165	нуклеотид	NANOS2 свинья 1-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:166	нуклеотид	NANOS2 свинья 1-3 Фиг. 14
SEQ ID NO:167	нуклеотид	NANOS2 свинья 2-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:168	нуклеотид	NANOS2 свинья 2-4 Фиг. 14
SEQ ID NO:169	нуклеотид	NANOS2 свинья 3-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:170	нуклеотид	NANOS2 свинья 4-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:171	нуклеотид	NANOS2 свинья 4-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:172	нуклеотид	NANOS2 свинья 10-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:173	нуклеотид	NANOS2 свинья 10-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:174	нуклеотид	NANOS2 свинья 11-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:175	нуклеотид	NANOS2 свинья 11-4 Фиг. 14
SEQ ID NO:176	нуклеотид	NANOS2 свинья 12-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:177	нуклеотид	NANOS2 свинья 12-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:178	нуклеотид	NANOS2 #1 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:179	нуклеотид	NANOS2 #1 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:180	нуклеотид	NANOS2 #2 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:181	нуклеотид	NANOS2 #2 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:182	нуклеотид	NANOS2 #3 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:183	нуклеотид	NANOS2 #3 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:184	нуклеотид	NANOS2 #4 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:185	нуклеотид	NANOS2 #4 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:186	нуклеотид	NANOS2 #5 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:187	нуклеотид	NANOS2 #5 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:188	нуклеотид	NANOS2 #6 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:189	нуклеотид	NANOS2 #6 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:190	нуклеотид	NANOS2 #7 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:191	нуклеотид	NANOS2 #7 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:192	нуклеотид	NANOS2 #8 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:193	нуклеотид	NANOS2 #8 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:194	нуклеотид	NANOS2 #9 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:195	нуклеотид	NANOS2 #9 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:196	нуклеотид	NANOS2 #10 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:197	нуклеотид	NANOS2 #10 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:198	нуклеотид	NANOS2 #11 поросенок Аллель-1 Фиг. 14
SEQ ID NO:199	нуклеотид	NANOS2 #11 поросенок Аллель-2 Фиг. 14
SEQ ID NO:200	нуклеотид	NANOS2 WT Фиг. 15
SEQ ID NO:201	нуклеотид	NANOS2 самец поросенок А-1 Фиг. 15
SEQ ID NO:202	нуклеотид	NANOS2 самец поросенок А-2 Фиг. 15
SEQ ID NO:203	нуклеотид	NANOS2 самка поросенок А-1 Фиг. 15
SEQ ID NO:204	нуклеотид	NANOS2 самка поросенок А-2 Фиг. 15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически редактированное сельскохозяйственное животное, пригодное для трансплантации ССК, включающее по меньшей мере одну редактированную хромосомную последовательность, кодирующую белок NANOS2, где указанная хромосомная последовательность редактирована таким образом, чтобы функциональный белок NANOS2 производился в небольшом количестве, либо не производился, где указанное сельскохозяйственное животное выбрано из свиньи или крупного рогатого скота.

2. Генетически редактированное сельскохозяйственное животное по п.1, где редактированная хромосомная последовательность включает интегрированную или удаленную последовательность.

3. Генетически редактированное сельскохозяйственное животное по п.1, где у указанного животного вырабатывается пониженное количество или отсутствуют клетки зародышевой линии, но сохраняется функция соматических клеток.

4. Генетически редактированное сельскохозяйственное животное по п.1, где редактированная хромосомная последовательность не включает экзогенно введенную последовательность.

5. Генетически редактированное сельскохозяйственное животное по п.1, дополнительно включающее систему условного нокаута для условной экспрессии белка NANOS2.

6. Генетически редактированное сельскохозяйственное животное по п.1, где редактированная хромосомная последовательность включает интегрированную репортерную последовательность.

7. Генетически редактированное сельскохозяйственное животное по п.1, где животное является гетерозиготным или гомозиготным по меньшей мере по одной редактированной хромосомной последовательности.

8. Генетически редактированное животное по п.1, где животное является свиньей или крупным рогатым скотом.

9. Генетически редактированное животное по п.8, где указанное животное является свиньей.

10. Генетически редактированное животное по п.9, где указанное животное включает редактированный ген NANOS2, включающий SEQ ID NO: 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 202, 203 или 204.

11. Генетически модифицированное животное по п.8, где указанное животное является крупным рогатым скотом.

12. Генетически редактированное животное по п.11, где указанное животное включает редактированный ген NANOS2 из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151 или 152.

13. Генетически редактированное животное по п.1, дополнительно включающее трансплантированные сперматогониальные клетки для создания реципиентного суррогатного самца с абляцией зародышевой линии.

14. Реципиентное суррогатное сельскохозяйственное животное-самец с абляцией зародышевой линии для получения спермы, включающее по меньшей мере одну редактированную хромосомную последовательность, кодирующую белок NANOS2, где указанная хромосомная последовательность редактирована таким образом, чтобы функциональная активность белка NANOS2 была низкой или отсутствовала, и где указанное сельскохозяйственное животное содержит трансплантированные сперматогониальные клетки, где указанное сельскохозяйственное животное выбрано из свиньи или крупного рогатого скота.

15. Клетка генетически редактированного сельскохозяйственного животного, пригодная для получения сельскохозяйственного животного для трансплантации ССК, включающая по меньшей мере одну редактированную хромосомную последовательность, кодирующую белок NANOS2, где указанная хромосомная последовательность редактирована таким образом, чтобы функциональный белок NANOS2 производился в небольшом количестве либо не производился, где указанное генетически редактированное сельскохозяйственное животное выбрано из свиньи или крупного рогатого скота.

16. Клетка генетически редактированного сельскохозяйственного животного по п.15, где редактированная хромосомная последовательность включает интегрированную или удаленную последовательность.

17. Клетка генетически редактированного сельскохозяйственного животного по п.15, где клетка является гетерозиготной или гомозиготной по меньшей мере по одной редактированной хромосомной последовательности.

18. Клетка генетически редактированного сельскохозяйственного животного по п.15, где клетка происходит из свиньи.

19. Клетка генетически редактированного сельскохозяйственного животного по п.18, где указанная клетка включает редактированный ген NANOS2 согласно SEQ ID NO: 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171,

172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 202, 203 или 204.

20. Клетка генетически отредактированного сельскохозяйственного животного по п.15, где клетка происходит из крупного рогатого скота.

21. Клетка генетически отредактированного сельскохозяйственного животного по п.20, где указанное животное включает отредактированный ген NANOS2, включающий SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151 или 152.

22. Клетка генетически отредактированного сельскохозяйственного животного по п.15, где отредактированная хромосомная последовательность не включает экзогенно введенную последовательность.

23. Клетка генетически отредактированного сельскохозяйственного животного по п.15, дополнительно включающая систему условного нокаута для условной экспрессии белка NANOS2.

24. Клетка генетически отредактированного сельскохозяйственного животного по п.15, где отредактированная хромосомная последовательность включает интегрированную репортерную последовательность.

25. Способ разведения сельскохозяйственных животных, включающий сбор спермы от реципиентного суррогатного самца с абляцией зародышевой линии по п.14 и введение указанной спермы самке животного таким образом, чтобы у указанной самки животного наступила беременность.

26. Способ по п.25, где указанное введение осуществляют путем искусственного осеменения.

27. Способ получения сельскохозяйственного животного, не имеющего функциональных спермато-гониальных клеток, включающий

редактирование по меньшей мере одной хромосомной последовательности, кодирующей белок NANOS2, где указанная хромосомная последовательность отредактирована таким образом, чтобы функциональный белок NANOS2 производился в небольшом количестве либо не производился, где указанное сельскохозяйственное животное-самец выбрано из свиньи или крупного рогатого скота.

28. Способ по п.27, где у указанного животного не вырабатывается существенное количество спермато-гониальных клеток.

29. Способ по п.27, где указанное редактирование осуществляют путем редактирования гена при помощи TALEN, цинк-пальцевой нуклеазы и/или слитого белка на основе рекомбиназы.

30. Способ по п.27, где указанный ген NANOS2 редактируют для включения вставки или делеции, которая вызывает инактивацию гена.

31. Способ по п.27, где указанный этап модификации с целью редактирования гена включает применение NANOS2-направленной РНК и полипептида, способного производить расщепление или интеграцию мишени NANOS2.

32. Способ по п.27, где указанный способ модификации с целью редактирования гена представляет собой РНК-направляемую CRISPR/Cas9.

33. Способ получения сельскохозяйственного животного-самца-реципиента, который служит суррогатным самцом для продукции происходящей от донора спермы для передачи донорского генотипа потомству путем естественного или искусственного размножения, включающий

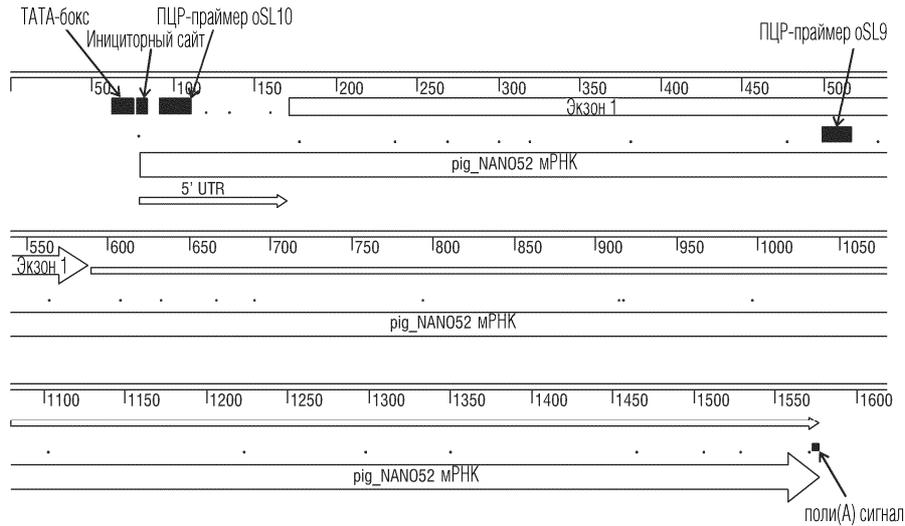
сбор донорских ССК от требуемого самца-донора, а затем

трансплантацию донорских ССК NANOS2-/- самцу-реципиенту с образованием спермато-генных колоний, где указанный NANOS2-/- самец-реципиент представляет собой генетически отредактированное сельскохозяйственное животное по п.1.

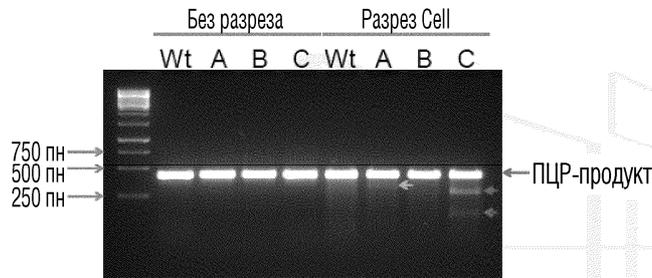
34. Способ по п.33, где указанный NANOS2-/- самец-реципиент включает отредактированную последовательность гена NANOS согласно SEQ ID NO: 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 152, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 201, 202, 203 или 204.

35. Способ получения сельскохозяйственных животных, включающий

осеменение самки сельскохозяйственного животного спермой NANOS2-/- самца-реципиента, охарактеризованного в п.33.



Фиг. 1



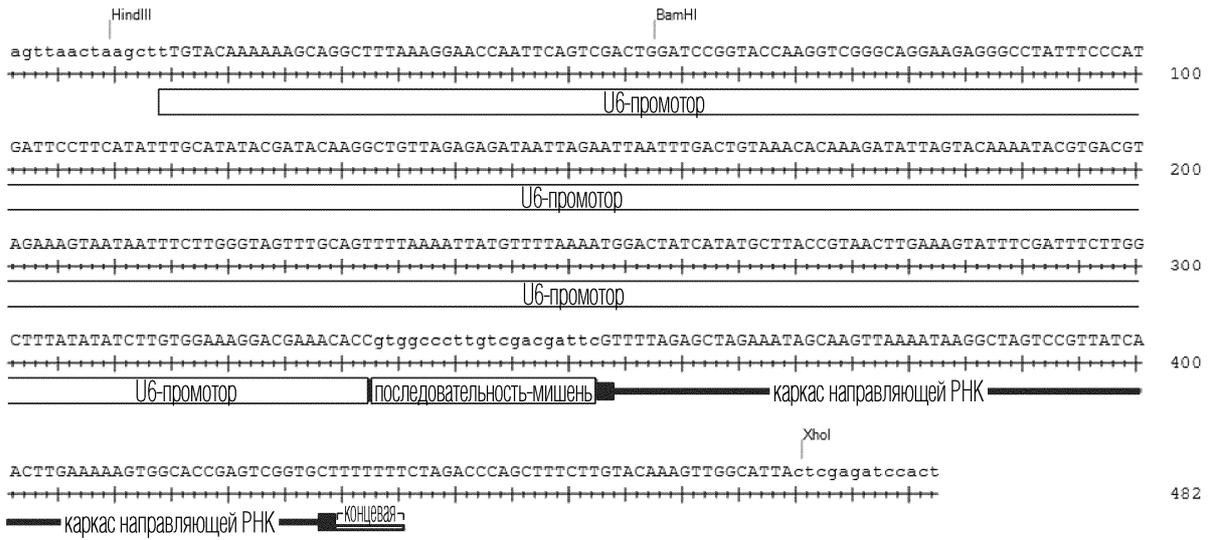
Фиг. 2

agttaactaagcttTGТАСАААААGСAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAATGGA STATCATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTCGATTTCTGGCTTTATATATCTTGGAAGGACGAAACACGaatcgtcgacaaggccagGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGТАСАААGTTGGCATTActcgatccact

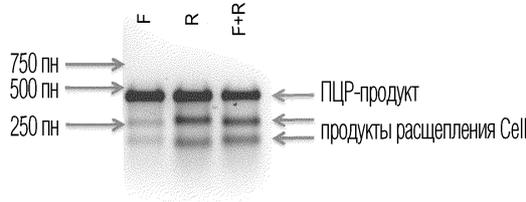
Фиг. 3А

agttaactaagcttTGТАСАААААGСAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAATGGAATCATATGCTTACCGT AACTTGAAAGTATTTCGATTTCTGGCTTTATATATCTTGGAAGGACGAAACACGtgggcccttgcgacgattcGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGТАСАААGTTGGCATTActcgatccact

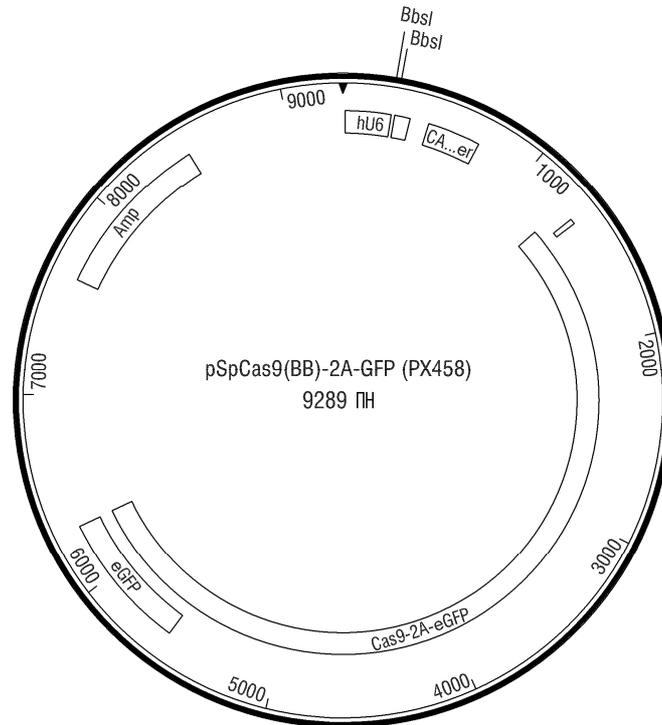
Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 4



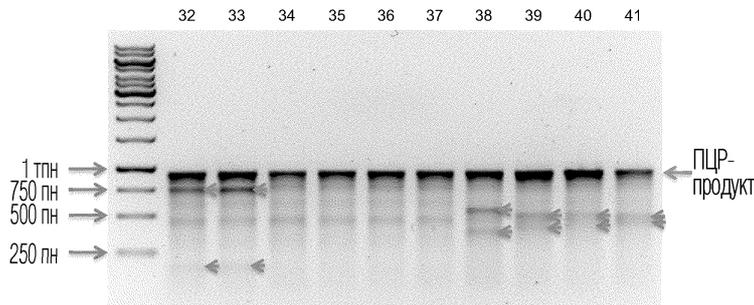
Фиг. 5А

acaccagctgcagaacgagaagctactgtactactcctgcagaatggcgggatatgtactgtgg accggaactggacatcaaccggctgcgactacgatggaccatctcgtcctcagagcttctga
 aggagcactccatgacaacaagggtgctgacaggaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtccctcgaagaggctggaagaagatgagaactactggcggcagctgctgaacgcc aagctg
 attaccacagagaagttcgacaactctgaccaagcgagagaggcggcctgagcga actgataaaggcggcttcatcaagagacagctgggaaaccggcagatcacaagacagctggcacagatcctgg
 actcccggaatgaaactaagtagcagcagaatgacaagctgacccgggaagtgaagtgatcacctgaagtgatccaagctgggttccgattccggaaaggattccagtttacaagtgccgag atcaacaact
 accaccacgcccacgacgctactcctgaaacggctggtgggaaccgcctgatcaaaaagtacctaaagctggaagcgagttctgtactggcgaactacaagggtgtagcagctgaggaaagatgacccaagagc
 gagcaggaatcgccaaggctacccgaactctctacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatcgggaagcggcctctgatcgagacaaaagg cgaaccgg
 ggagatcgtgtgggataaaggcgggattttg ccacctgcgaaagtgtgagcatgcccaagtgaatctgtgaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaaagctctcctgccaaaggga
 acagcgataagctgatcgcagaagaaggactgggacctaagaagtacggcgcttcagaccccacgtggcttattctgtgctgggtggcacaagtggaaaaggcgaagtcacaagaaa ctgaagag
 tgtgaaagagctgctggggatcacatcatggaagaagcagcttcgagaagaatccatcgaacttttggaaagcgaaggctacaagaagtgaaaaaggacatgatcaagctgcttaagtactccctgtt
 cgagctggaaaacggccggaagagaatctggcctctccggcgaactgcagaagggaacgaactggcctgcctccaatattgtaacttctgtactggccacatgagaagctga agggctccc
 ccgaggataatgagcagaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcagattctccaagagagtgatcctggcccagcgtaatctggcaaaagctgtctccg ct
 acaacaagcaccgggataagccatcagagagcaggccgagaatattcatcactgtttaccctgaccaatctgggagcccctgccccttcaagctcttgaccaccatcagccggaagagg tacaccagca
 ccaagagggtgctggacgcccctgatccaccagagcatcaccgctgtacgagacaggtatcgactgtctcagctgggaggcgcaaaaaggccggcggccacgaaaaggccggccagca aaaaaga
 aaaaagaaatcggcagtgaggaggcagaggaatctgtaacatgcggtgacgtcgagagaatcctggcccagtgagaagggcgaggagctgttaccgggggtggtgccatct ggtcagctggagcg
 cgcgtaaacggcacaagttcagcgttccggcagggcgaggcgatgcacactcggcagctgacccctgaagttcatctgcaccggcaagctgcccgtccctggccacccctgtga ccaacctgac
 ctacggcgtgagcttccagcctacccccaccatgaaagcagcagacttctcaagctccgcatccggaagctacgtccaggagcgcacatcttctc aaggacagcggcaactacaagaccggcgc
 cgaggtgaaatcagggcgacaacctggtgaaccatcgagctgaaggcgactcgaaggaggacgccaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccaacagctctata tcatggcc
 gcacaagcagaagaacggcctcaagtgaaactcaagatccccaacatcgaggcggcagcgtgagctcggcaccactaccagcagaaca cccccatggcgcagcccccgtgctgtcccgaacc
 actacctgagcaccagctccgctgagcaaaagaccacaagcagagcagatcacatggtctctgctgagttgtgaccccgccgggatcactctcggcatgctgacagagctgacaaaggaaatc taactagagc
 tcgctgatcagcctcagctgcttctagtccagcactctgtttgccctccccgctcctctgacccggaa ggtgccactcccactgcttcttaataaaatgaggaaatgcatcagctgtctgag
 taggtgtacttattctgggggtgggggtggggcaggacagcaaggggaggattggaaagagaatagcagcagctggggagcggccgaggaaaccctagtgatggaatggccactccct ctctcgcg
 ctgctgctcactgagccggcgacaagaagtcgcccagcgggctttgcccggcg cctcagtgagcagcagcagcagctgctgagggggcctgagtgaggtattttctcttacatctgtg
 cggtatttcacaccatagctcaagcaacatagtagcgcctgtagcggcgatgaagcggcggtgtggtggttaacgagcagctgaccctacactgccaagccttagcggccg tccttctcctt
 cttccctcttctcgcacgttccggcttccccgtaagct ctaaatcggggctcctttagggttccgattagcttctacggcactgcagcccaaaaactgattgggtaggttcacgtatggtggcc
 atcgcctatagacgggttttccctttgagctgtgagctcagcttcttaaatagtgactctgttccaactggaacaactcaaccatctcgggctattctttgattataaggga ttttccgatttcggcc
 tattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaaatttaacgcaatttaaaaaatattaaagcttcaattttatggtgcaactctcagtaaatctgctgatgacgcatagtaagccagcccagaccggcca

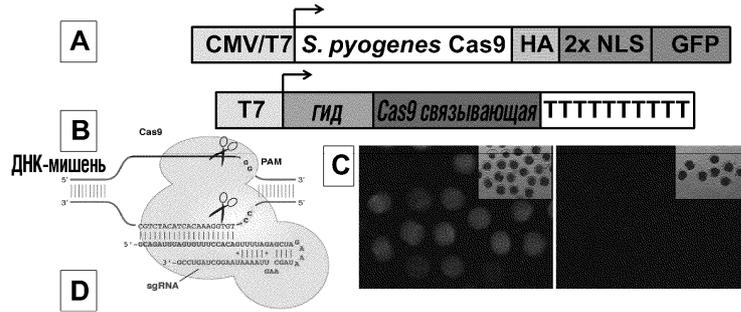
Фиг. 5С2

acaccgctgacgcgcccagggctgtctgctcccggatccgcttacagaacagctgaccgtctccgggagctgatgtgtagaggttttaccgtcatcaccgaaacgcgcgagagc aaaggcctcg
 tgatacgcctattttataggttaatgtcatgataataatgtttcttagagctcaggtggcactttccgggaaatgtgcgagcaaccctattgtttttttaaatacatcaaatatgt atccgctcatgagac
 aataaccctgataaatgcttaataatgtaaaaaggagagtagtattcaacattccgtgctccctattcccttttggcgattttgccttctgttttgtctac ccagaacgctggtgaaagtaaaa
 gatgtgaaagatcagttgggtgacaggtgggttatcatgaaactggtatctcaacagcggtgaagatcctgagagtttcccccagaagcttttcaatgatgagcacttttaagtctctgt atgtggcgcggta
 ttaaccgtattgacggccggcaagagcaactggctgcccatacactattcagaatgactggtgagtagtactaccagtcacagaaaaagc atctacagatggcagatgagaagaatagcagtgctgc
 cataaccatgagtgataaactcggccaaactctctgacaacgacgagggaccgaaaggagctaaaccgctttttgcaacaatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccgg agctgaaatgaa
 gccataccaaaacgagcagctgacaccagatgctgtagcaatggcaaacgttgccgcaaacatttaactggcga actactactctagcttcccgcaacaataatagactggatggaggcggataaagtt
 gcaggaccactctgcctcggccttccggctgggtttatgctgataaatcggaccggtagcgtggaagccggtatcattgagcactggggccagatgtaagccctccgta cgtgatgtactac
 acgacggggagtcaggcaactatgagtaaacgaaatagacagatcgtgagatagtgcc tcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactatataacttttagattgattaaaactcattttaa
 tttaaaagatcagtggaagatcctttgataatctatgacaaaatccctaaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccagtaaaaagatcaaaaggatcttctgagatccttt tttctgcgctaat
 ctgctgtgcaaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttccggatcaagagctaaccaacttttccgaaggttaactggtctcagcagagcgcagatacaaaaactgtctcttagtagcggta
 gttaggccaccacttaagaactgtgacccgctacatacctcgtctgtaactcctgttaccagtggtgctccagtggaataagctgcttaccgggttgactcaagacgatagt taccggataaggc
 gcagcgtcgggctgaacggggggtctgtgacacagcccagcttggagcgaacgacacacgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacag
 gtatccggtaagcggcagggtcggaaacagagagcgcagagggagcttccaggggaaacgctgtatctttatagctcgtcgggttcccaacctgactgagcgtcagctgattttgtgat gctctcagggg
 ggcggagcctatgaaaaaacccagcaacgccccttttaccggttctggtccttttctgacatgt

Фиг. 5С3



Фиг. 6А



NANOS(CRISPR)

Nanos2 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N1-1 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-CCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N1-2 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-----TCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N3-2 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-----TCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N3-3 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-CCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N5-2 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-CCCTTGTCCACAATTCTGGATCATTCCC
 N5-3 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-----TCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N6-1 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGTCC-CGGGCCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N7-2 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCC-----CCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N7-3 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG--CCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N10-2 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCT-----GTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N11-2 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCC-----CCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC
 N12-2 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-CCTTGTGCGTCAATTCTGGATCAGTCCC
 N12-3 TTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-----TCGACAATTCTGGATCAGTCCC

Фиг. 9

NANOS CCCGGTGCCCGGGCCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGTCCC AACACCACCTGG
 NN6-1 CCCGGTGCCCGGGCCCTTGTGCGACGATCAGCCCTTCTGGATCAGTCCC AACACCACCTGG
 NN7-1 -----
 NN7-2 -----

Фиг. 10А

Nanos2 CTCAGGTCTTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGT
 N3-1-3 CTCAGGTCTTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-CCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGT
 N3-2-3 CTCAGGTCTTGGCTCCCCGGTGCCCGGGTGCC-CGGGCCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGT
 N3-6-2 CTCAGGTCTTGGCTCCCCGGTGCCCGGGTGCC-CGGGCCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGT
 N3-7-3 ATCAGNNCTTGGCTCCCCGGTGCCCG-----GGGCCTCTGCCACGATTCTGGATCAGT
 N3-8-3 CTCAGGTCTTGGCTCCCCGGTGCCCG-----GGGCCTCTGTCGACGATTCTGGATCAGT
 N3-10-2 CTCAGGTCTTGGCTCCCCGGTGCCCG-----GGGCCTCTGTCGACGATTCTGGATCAGT
 N3-12-2 CTCAGGTCTTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTGTGCGAC--TTCTGGATCAGT
 N3-12-3 CTCAGGTCTTGGCTCCCCGGTGCCCGGGCCCTTG-CCCTTGTGCGACGATTCTGGATCAGT

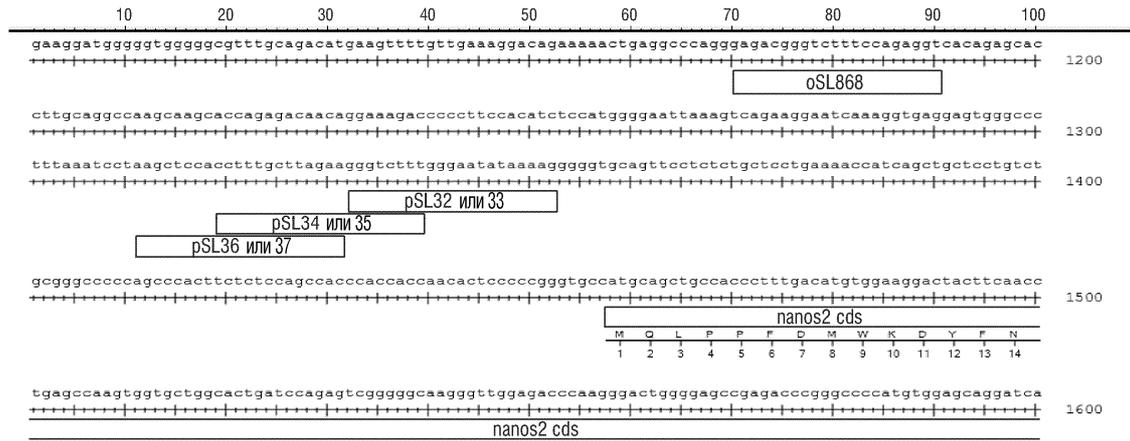
Фиг. 10В

Никазная пара:

OHPHK1: GCACCAGCTGAAGACACCGGAGG"
 OHPHK2: GCTGGTGCAGGAGTACACGTGG"

Nanos: GAATCTCGCCACGTGTA CTCTCGCACCAGCTGAAGACACCGGAGGGCGTGGTGGTGTGCCAT
 N2-3: GAATCTCGCCACGTGTA CTCTCGCACCAGCTGAAGACACCGGAGGGCGTGGTGGTGTGCCAT
 N3-1: GAATCTCGCCACGTGTA CTCTCGCACCAGCTGAAGACACCGGAGGGCGTGGTGGTGTGCCAT
 N4-2: GAATCTCGCCACGTGTA CTCTCGCACCAGCTGAAGACACCGGAGGGCGTGGTGGTGTGCCAT
 N5-2: GAATCTCGCCACGTGTA CTCTCGCACCAGCTGAAGACACCGGAGGGCGTGGTGGTGTGCCAT
 N6-3: GAATCTCGCCACGTGTA CTCTCGCACCAGCTGAAGACACCGGAGGGCGTGGTGGTGTGCCAT
 N7-1: GAATCTCGCCACGTGTA CTCTCGCACCAGCTGAAGACACCGGAGGGCGTGGTGGTGTGCCAT

Фиг. 11



Фиг. 12

Последовательность направляющей РНК

GATCAGTCCCAACACCACC_TGG (обратная ориентация)

NANOS2 ORF:

1 ATGCAGCTGC CACCSTTTGA CATGTGGAAG GACTACTTCA ACCTGAGCCA
M Q L P P F D M W K D Y F N L S Q

51 GGTGGTGTG GGA CTGATCC AGAATCGTCG ACAAGGGCCA GAGGCCCCGG
V V L G L I Q N R R Q G P E A P G

101 GCACCGGGGA GCCAAGACCT GAGCCCCAC TGGAGCAGGA CCAGGGCCCG
T G E P R P E P P L E Q D Q G P

151 GGAGAGCGGG GGGCCACGG GGGGCTGGCC ACCCTCTGCA ACTTTTGCAA
G E R G A S G G L A T L C N F C K

201 ACACAATGGG GAATCTCGCC ACGTGTACTC CTCGCACCAG CTGAAGACAC
H N G E S R H V Y S S H Q L K T P

251 CGGAGGGCGT GGTGGTGTGT CCCATCCTAC GACACTATGT GTGTCCCCTG
E G V V V C P I L R H Y V C P L

301 TCGGGGGCCA CCGGTGACCA GGCTCACACA CTCAAAGTACT GCCCGCTCAA
C G A T G D Q A H T L K Y C P L N

351 CGGCGGCCAG CAGTCTCTCT ATCGCCGCG TGGGCGCAAT TCAGCCGGCC
G G Q Q S L Y R R S G R N S A G R

401 GCAAGGTCAA GCGTGA
K V K R *

Фиг. 13

1й помет**#1 поросенок (самец) - Мозаичные 3 аллеля**

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 1-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGT-----TGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 1-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 1-3 СТАТТСААССТGAGCCAGGGAC---TGGGACTGATCCAGAA

#2 поросенок (самец) - - Tag #137 (гомозиготный нокаут)

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGG-TGTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 2-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 2-4 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG--TGTGGGACTGATCCAGAA

#3 поросенок (самка)

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 3-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGT-----TGGGACCGATCCAGAA

#4 поросенок (самка)

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 4-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 4-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TTGGGACTGATCCAGAA

2ой помет**#1 поросенок (самец)**

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 10-1 СТАТТСААССТGAGCCAGG-----ACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 10-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TTGGGACTGATCCAGAA

#2 поросенок (самец)

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 11-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTGT---TGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 11-4 СТАТТСААССТGAGCCAGGT-----TGGGACTGATCCAGAA

#3 поросенок (самка)

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGT-G--GTGTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 12-1 СТАТТСААССТGAGTCAGGT-----GTTGGGACTGATCCAGAA
 Nanos свинья 12-2 СТАТТСААССТАAGCCAGGTGAAGTGTGGGACTGATCCAGAA

Фиг. 14А

3й помет**#1 поросенок (самка)**

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TTGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG-TGTGGGACTGATCCAGAA

#2 поросенок (самка)

Аллель-1 СТАСТСААССТGAGCCAGG-GGTG---GGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG-TGTGGGACTGATCCAGAA

#3 поросенок (самка)

Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TTGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TTGGGACTGATCCAGAA

#4 поросенок (самец) - - Tag #146 (гомозиготный нокаут)

Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 ---150bp Deletion-----TGGGACTGATCCAGAA

#5 поросенок (самец)

Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTGAAAGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGT-----GTTGGGACTGATCCAGAA

#6 поросенок (самец)

Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTGT---TGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGTGT---TGGGACTGATCCAGAA

#7 поросенок (самец)

Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGT-----TGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGT-----TGGGACTGATCCAGAA

#8 поросенок (самец) - - Tag #144 (гомозиготный нокаут)

Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG-TGTGGGACTGATCAATAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TGGGACTGATCCAGAA

#9 поросенок (самец)

Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG---TTGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGGGGTGGGACTGATCCAGAA

#10 поросенок (самец)

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTGTT---GGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAGGT--T---GGGACTGATCCAGAA

#11 поросенок (самец) - - Tag #251 (гомозиготный нокаут)

Nanos WT СТАТТСААССТGAGCCAGGTGGTGTGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-1 СТАТТСААССТGAGCCAGGTG-TGTGGGACTGATCCAGAA
 Аллель-2 СТАТТСААССТGAGCCAG-----AA

Фиг. 14В

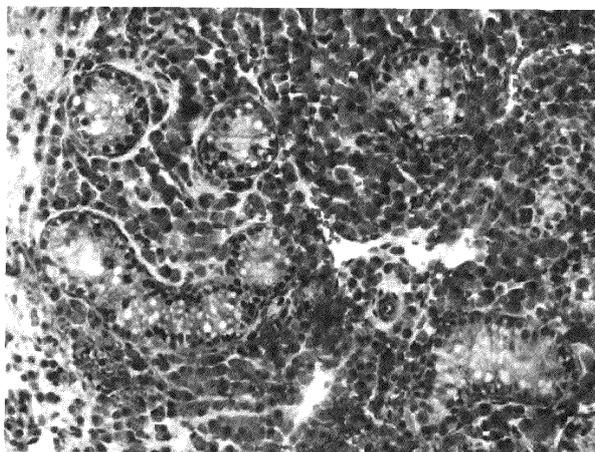
Генотип NANOS2-нулевого самца поросенка

Nanos WT	ATCCAGAATCGTCGACAAGGGCCAGAGGCCCCCGGGCACCGGGGAGCCAAGA
Аллель-1	ATCCAGAATCGTCGACAAGGGCC-----CCGGGCACCGGGGAGCCAAGA
Аллель-2	ATCCAGAATCGTCGACAAGGGCC-----CCGGGCACCGGGGAGCCAAGA

Генотип NANOS2-нулевых самок поросят

Nanos WT	ATCCAGAATCGTCGACAAGGGCCAGAGGCCCCCGGGCACCGGGGAGCCAAGA
Аллель-1	ATCCAGAATCGTCGACGACGCG-AGAAGCCCGGGCACCGGGGAGCCAAGA
Аллель-2	ATCCAGAATCGTCGA-----GGCCCGGGCACCGGGGAGCCAAGA

Фиг. 15



Фиг. 16

