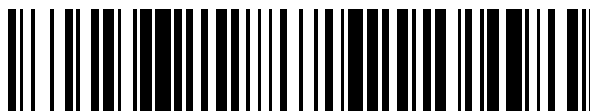


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 056**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2013 PCT/KR2013/007592**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14178485**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2013 E 13883590 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2993234**

54 Título: **Vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa, animal transgénico para xenotrasplante introducido con el vector, y método de fabricación del mismo**

30 Prioridad:

30.04.2013 KR 20130047938

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2019

73 Titular/es:

**KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL
COOPERATION CORP. (50.0%)
120, Neungdong-ro
Gwangjin-guSeoul 05029, KR y
THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF
MISSOURI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, JIN HOI;
KWON, DEUG NAM;
PARK, JONG YI;
LEE, KIHO;
PRATHER, RANDALL S.;
KIM, JAE HWAN y
KANG, MAN JONG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 703 056 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa, animal transgénico para xenotrasplante introducido con el vector, y método de fabricación del mismo

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a un vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa, un animal transgénico no humano para xenotrasplantes introducido con el vector, y un método para fabricar el mismo.

[Estado de la técnica]

Según la Red Coreana para el Intercambio de Órganos (KNOS), en general, aproximadamente 20.000 pacientes esperan un trasplante de órganos en Corea cada año, pero el número real de órganos que se donan es, según se informa, incluso menos del 10% de lo que se requiere para el trasplante de órganos. Además, en los Estados Unidos, al número de pacientes en la lista de espera para trasplante de órganos se agrega adicionalmente uno cada 16 minutos, sin embargo, 11 pacientes por día en la lista de espera están en condiciones de enfrentar la muerte sin recibir el órgano requerido trasplante. En este sentido, el desarrollo de tecnologías en las ciencias de la vida sirve de fondo para el desarrollo de tecnologías para xenotrasplante.

El progreso continuo en la genética animal ha hecho posible producir animales transgénicos comercialmente útiles junto con la verificación funcional de cada gen mediante la eliminación o inserción de un gen particular. Los ejemplos de los métodos para producir animales transgénicos no humanos incluyen métodos aleatorios de direccionamiento a genes usando microinyección o infección viral, y métodos de direccionamiento a genes que manipulan genes particulares utilizando células madre embrionarias no humanas o células somáticas.

El método de microinyección es un método convencional para insertar ADN foráneo en un pronúcleo de un óvulo fertilizado y se ha usado ampliamente para la fabricación de animales transgénicos no humanos (Harbers et al., *Nature*, 293 (5833): 540-2, 1981; Hammer et al., *Nature*, 315 (6021): 680-683, 1985; van Berkel et al., *Nat. Biotechnol.*, 20 (5): 484-487, 2002; Damak et al., *Biotechnology (NY)*, 14 (2): 185-186, 1996). Sin embargo, la eficiencia de los ovocitos no humanos transgénicos vivos derivados de los óvulos fertilizados, en los que se insertó ADN foráneo mediante microinyección, es muy baja para alcanzar solo del 2% al 3% (Clark et al., *Transgenic Res.*, 9: 263-275, 2000), y es imposible regular la ubicación de la inserción de un gen foráneo o eliminar un gen endógeno particular en el mismo.

El método de infección viral también se usa ampliamente para el direccionamiento a genes animales (Soriano et al., *Genes Dev.*, 1 (4): 366-375, 1987; Hirata et al., *Cloning Stem Cells*, 6 (1): 31-36, 2004). En el método de infección viral, el gen que se inserta se introduce como un gen de un animal por un vector viral y, por lo tanto, este método es más eficiente que el método de microinyección; sin embargo, este método todavía no puede insertar un gen foráneo en una ubicación particular o eliminar un gen endógeno particular en el mismo. Además, el tamaño máximo de un gen que se insertará está limitado a 7 kb, y las proteínas expresadas por el virus se convierten en un problema (Wei et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 119-141, 1997; Yáñez et al., *Gene Ther.*, 5 (2): 149-159, 1998).

Para superar los problemas descritos anteriormente, puede usarse una tecnología de direccionamiento a genes capaz de eliminar o insertar un gen particular. La tecnología de direccionamiento a genes se utilizó por primera vez en el estudio de las funciones genéticas utilizando células madre embrionarias de ratón. La producción de ovocitos vivos manipulados genéticamente de un gen particular se hace posible mediante la inserción de una célula madre embrionaria de ratón, en la que se manipula el gen particular, en un embrión en la etapa de blastocisto mediante una recombinación homóloga. Al emplear el método de direccionamiento a genes en una célula madre embrionaria de ratón, se produjo un ratón en el que se manipularon un gran número de genes particulares (Brandon et al., *Curr. Biol.*, 5 (6): 625-634, 1995; Capecchi et al., *Science*, 244 (4910): 1288-1292, 1989; Thompson et al., *Cell*, 56 (2): 313-321, 1989; Hatanaka et al., *Hum. Mol. Genet.*, 9 (3): 353-361, 2000; Thomas et al., *Cell*, 51 (3): 503-512, 1987; te Riele et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (11): 5182-5132, 1992; Mansour et al., *Nature*, 336 (6197): 348-352, 1988; Luo et al., *Oncogene*, 20 (3): 320-328, 2001). Cuando el método de direccionamiento a genes se aplica al ganado, es posible producir un animal modelo de enfermedad que se puede usar en xenotrasplantes utilizando un biorreactor animal o eliminando un gen particular involucrado en respuestas de rechazo inmunológico o sobreexpresando el gen en una ubicación particular, y se espera que estos aporten un gran beneficio económico desde el aspecto industrial.

En la producción de animales no humanos con direccionamiento a genes, el uso de células madre embrionarias se ha considerado esencial. Sin embargo, el uso de sus células madre en el ganado ha sido limitado, aunque se han informado líneas celulares similares a las células madre embrionarias en el ganado, incluidos los cerdos y las vacas (Doetschman et al., *Dev. Biol.*, 127 (1): 224-227, 1988; Stice et al., *Biol. Reprod.*, 54 (1): 100-110, 1996; Sukoyan et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 36 (2): 148-158, 1993; Iannaccone et al., *Dev. Biol.*, 163 (1): 288-292, 1994; Pain et al., *Development*, 122 (8): 2339-2348, 1996; Thomson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (17): 7844-7848, 1995; Wheeler et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 6 (5): 563-568, 1994). En cambio, junto con la sugerencia de que se pueden usar células somáticas generales como una célula donante nuclear en la selección de genes, se ha hecho posible la producción de ganado transgénico (Brophy et al., *Nat. Biotechnol.*, 21 (2): 157-162, 2003; Cibelli et al., *Science*, 280

(5367): 1256-1258, 1998; Campbell et al., Nature, 380 (6569): 64-66, 1996; Akira Onishi et al., Science, 289: 1188-1190, 2000 Denning et al., Cloning Stem Cells, 3 (4): 221-231, 2001; McCreath et al., Nature, 405 (6790): 1066-1069, 2000).

5 Mientras tanto, como una fuente de suministro óptima para el xenotrasplante, se consideran cerdos en miniatura capaces de suministrar una gran cantidad de órganos debido a las similitudes en el tamaño y las características fisiológicas de los órganos con respecto a los humanos y la fecundidad.

10 El éxito del trasplante de órganos porcinos se basa en si pueden superarse una serie de respuestas de rechazo inmunológico (respuestas de rechazo inmunológico hiperagudas, vasculares agudas, mediadas por células y crónicas). Según se informa, la respuesta de rechazo inmunológico hiperaguda, que ocurre unos pocos minutos después del trasplante, podría superarse mediante la eliminación del gen o los genes implicados en la síntesis del determinante antigénico de la alfa-1,3-galactosiltransferasa y la sobreexpresión de los genes reguladores del complemento humano.

15 Específicamente, un cerdo clonado somático, en el que la alfa-1,3-galactosiltransferasa (en lo sucesivo, "GT") se eliminó de forma heterocigota, fue producida primero por PPL Co., Ltd. de Inglaterra en 2002 (Yifan Dai et al., Nat. Biotechnology, 20: 251-255, 2002). El gen GT es un gen que causa una respuesta de rechazo inmunológico agudo, y cuando este gen se elimina, es posible desarrollar un animal modelo de enfermedad para el xenotrasplante, en el que se eliminan las respuestas de rechazo *in vivo*.

20 En 2003, la compañía anterior tuvo éxito en la replicación de células somáticas cuando se eliminó el gen GT (publicación de la solicitud de patente KR No. 10-2009-0056922) y de este modo logró un avance notable en la producción de un animal modelo de enfermedad para trasplante de órganos para resolver el problema actual de la falta de suministro de órganos para trasplante (Carol J. Phelps, Science, 299: 411-414, 2003). En 2005, un órgano, derivado de un cerdo clonado donde se eliminó el gen GT, se trasplantó a un mono, y como resultado, se informó que la supervivencia se mantuvo hasta 2 a 6 meses después del trasplante sin respuesta de rechazo inmunológico agudo (Kenji Kuwaki et al., Nature Medicine, 11 (1): 29-31, 2005). Sin embargo, se informó que, incluso con la eliminación del gen GT, puede producirse una respuesta de rechazo grave durante el trasplante de órganos mediante la activación de genes del complemento humano causados por los xenoantígenos que pueden atravesar una ruta diferente (Tanemura, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 235: 359-364, 1997; Komoda, H. et al., Xenotransplantation, 11: 237-246, 2004). Para resolver el efecto adverso, se utilizó un método que produce cerdos clonados capaces de sobreexpresar genes inhibidores del complemento humano, como el CD59, un factor de aceleración de la desintegración (en adelante, "DAF") y una proteína cofactor de la membrana (en adelante, "MCP"), junto con la eliminación del gen GT (Yoichi Takahagi, Molecular Reproduction and Development 71: 331-338, 2005 Cozzi, Eb et al., Transplant Proc., 26: 1402-1403, 1994; Fodor, WL et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11153-11157, 1994; Adams, DH et al., Xenotransplantation, 8: 36-40, 2001).

35 Mientras tanto, se informó que el determinante de antígeno del ácido N-glicolilneuramínico (en adelante, "Neu5Gc"), que está presente en la mayoría de los mamíferos, excepto los humanos, también puede causar una respuesta de rechazo inmunológico durante el xenotrasplante (documento WO20061133356A; Pam Tangvoranuntakul, Proc. Natl Acad. Soc. USA 100: 12045-12050, 2003; Barbara Bighignoli, BMC genetics, 8: 27, 2007). Neu5Gc se convierte a partir del ácido N-acetilneuramínico (en adelante, "Neu5Ac") por CMAH.

40 Los complementos son complejos de proteínas (C1-C9) que consisten en proteínas involucradas en las respuestas inmunes, y tienen las actividades de fijación del complemento, en las cuales los complementos, al formarse un complejo antígeno-anticuerpo, se unen a las membranas celulares de las bacterias y, por lo tanto, producen agujeros y una opsonización, en la que los complementos se unen al complejo antígeno-anticuerpo y promueven la fagocitosis. Se han descubierto varias proteínas que regulan las actividades de los complementos, y estas proteínas reguladoras regulan los complementos impidiendo la activación de los complementos o promoviendo la lisis de los complementos activados. La DAF presente en las membranas celulares de una célula huésped puede prevenir la unión entre C2 y C4b, y MCP promueve la lisis de C4b y evita la activación de complementos en una célula huésped, lo que evita la activación de los complementos y evita la destrucción de la célula huésped por los complementos. CD59, que está presente en la superficie de una célula huésped, puede evitar la unión entre C7, C8 y C5b6 y, por lo tanto, prevenir la formación de un complejo de ataque de membrana.

45 Además de los genes que regulan las actividades de los complementos, se informó que la trombosis se puede inhibir por la sobreexpresión del gen CD39 humano, que ocurre durante el xenotrasplante (documento US20080003212A, Karren, MD, The Journal of Clinical Investigation, 113: 1440-1446, 2004).

50 Según un informe anterior, la expresión de un gen foráneo en un lugar distinto del lugar en el que normalmente se expresa puede causar un trastorno en el desarrollo embrionario y es fatal para el sistema nervioso que se desarrolla principalmente en la etapa posterior de desarrollo embrionario y en la etapa temprana después del nacimiento (Gao et al., Neurochem. Res., 24 (9): 1181-1188, 1999).

La publicación de la solicitud de patente KR No. 10-2009-0104328, como referencia relevante, se refiere a células madre neuronales que expresan CD70 y su uso para la prevención de respuestas inmunitarias en trasplantes, y describe una composición para inhibir respuestas inmunitarias en órganos, tejidos, o células trasplantados que incluyen las células madre neuronales que expresan CD70, y un método para inhibir las respuestas inmunes de un individuo que usa la composición.

La publicación de la solicitud de patente KR No. 10-2001-0034847, como otra referencia relevante, se refiere a moléculas de unión derivadas de inmunoglobulinas que no desencadenan lisis mediada por el complemento, que, como moléculas de unión de un polipéptido recombinante que contiene (i) un dominio de unión que puede unirse a una molécula objetivo, y (ii) un dominio efector que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene una homogeneidad sustancial en la totalidad o parte del dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, se caracterizan porque las moléculas de unión pueden unirse a las moléculas objetivo sin una grave lisis dependiente del complemento o destrucción de la mediación celular del objetivo, y más preferiblemente, las moléculas de unión en las que el dominio efector puede unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. En general, las moléculas de unión se basan en los dominios químicos derivados de dos o más de los dominios CH2 de la cadena pesada de inmunoglobulina humana. En un ejemplo de realización, el dominio 233-236 y el dominio 327-331 se corrigen, y los residuos más allá hacen que las moléculas sean alotípicas nulas. Los dominios de unión pueden inducirse a partir de fuentes de suministro arbitrarias adecuadas para la aplicación en las moléculas anteriores, por ejemplo, anticuerpos, enzimas, hormonas, receptores, citoquinas o antígenos, ligandos y moléculas adhesivas. Además, se divulgan ácidos nucleicos, células huésped, procesos de producción y materiales, por ejemplo, se divulgan los usos para la prevención de la activación de células B, la desgranulación de células mamarias y la fagocitosis, o para la prevención de la segunda molécula de unión a la molécula objetivo.

[Divulgación]

[Problema técnico]

La presente invención está ideada por las necesidades descritas anteriormente, y un objeto de la presente invención es proporcionar un vector de inactivación para un gen que sintetiza el determinante del xenoantígeno (CMAH).

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una línea celular somática transgénica que usa un vector que tiene mayor eficacia y precisión, en comparación con los vectores de direccionamiento convencionales.

Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar un animal clonado no humano fabricado mediante trasplante nuclear de la línea celular somática no humana.

Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar un método para producir xenoórganos para trasplante, que no presentan rechazos inmunitarios, incluyendo la cría de animales clonados no humanos, seguido de la extracción de los órganos.

[Solución técnica]

Con el fin de lograr los objetivos anteriores, la presente divulgación proporciona un vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa que incluye el brazo 5' de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa, PGKneopoliA, y el brazo 3' de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa en orden secuencial.

En un ejemplo de realización de la presente divulgación, el brazo 5' de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa incluye preferiblemente la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 1, pero no está limitada a la misma.

En otro ejemplo de realización de la presente divulgación, el PGKneopoliA incluye preferiblemente la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 2, pero no está limitada a la misma.

En otro ejemplo de realización de la presente divulgación, el brazo 3' de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa incluye preferiblemente la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 3, pero no está limitada a la misma.

En otro ejemplo de realización de la presente divulgación, el vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa incluye preferiblemente el mapa de restricción descrito en la FIG. 4, pero no se limita al mismo.

Además, la presente divulgación proporciona un método para fabricar células de inactivación de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa incluyendo transfectar el vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa de la presente divulgación y un vector de nucleasa de dedos de zinc a las células.

En un ejemplo de realización de la presente divulgación, el vector de nucleasa de dedos de cinc incluye preferiblemente el mapa de restricción descrito en la FIG. 1, pero no se limita al mismo.

Además, la presente divulgación proporciona células de inactivación de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa fabricadas por el método de la presente invención.

5 Las celdas de inactivación anteriores de la presente divulgación se depositaron en la División de Infraestructura Biológica, Instituto de Investigación de Biociencia y Biotecnología de Corea, localizada en Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 34141, Corea, el 2 de julio de 2013 bajo el número de depósito KCTC 12439BP.

10 Además, la presente divulgación proporciona un método para fabricar animales exclusivos de seres humanos mediante trasplante nuclear de células inactivadas no humanas de CMP- ácido acetilneuramínico hidroxilasa.

Además, la presente invención proporciona un método para producir xenoorganismos para trasplante, que se eliminan de los rechazos inmunitarios, incluyendo la cría de animales clonados no humanos seguido de la ablación de los órganos.

15 Como se usa en el presente documento, el término "vector de direccionamiento a genes" se refiere a un vector que puede eliminar o insertar un gen objetivo en una ubicación de un gen particular, y el vector incluye una secuencia homóloga de nucleótidos al gen particular al que se dirige para que ocurra una recombinación homóloga.

20 Como se usa en el presente documento, el término "homólogo" se refiere al grado de identidad en la secuencia de ácido nucleico de un gen correspondiente al primer dominio o al segundo dominio, y que tiene al menos el 90% de identidad, y preferiblemente el 95% o más de identidad.

25 Como se usa en el presente documento, el término "determinante de antígeno" se refiere a una región que es reconocida como un antígeno por un sistema inmune de un receptor en el momento del xenotrasplante, y es ácido N-glicolilneuramínico (en adelante, "Neu5Gc"), que es un glicano de la superficie celular, y "gen sintetizador determinante de antígeno" se refiere a un gen que codifica una enzima que biosintetiza el determinante de antígeno, y es CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa (en adelante, "CMAH") involucrado en la biosíntesis de Neu5Gc.

30 Como se usa en el presente documento, el término "marcador de selección" es para la selección de células transfectadas por un vector de direccionamiento a genes, y marcadores que producen fenotipos seleccionables tales como resistencia a fármacos, requerimiento de nutrientes, resistencia a agentes citotóxicos y expresión de proteínas de superficie y se refiere a un marcador que permite una selección positiva al permitir que sobrevivan solo aquellas células que expresan marcadores particulares en el medio ambiente tratado con un agente selectivo, y "gen marcador selectivo" se refiere a un gen que codifica el marcador de selección positiva, por ejemplo, la neomicina fosfotransferasa (en adelante, "neo") se utiliza para seleccionar células transfectadas estables en células eucariotas, al brindar resistencia a los antibióticos para que las células eucarióticas puedan sobrevivir en un medio que contiene el antibiótico neomicina.

40 El término "transformación" se refiere a una introducción de ADN en una célula huésped y hace que el ADN sea replicable como un factor extracromosómico o de integración cromosómica. La transformación incluye cualquier método que pueda introducir cualquier molécula de ácido nucleico en un organismo, una célula, un tejido o un órgano, y puede realizarse utilizando cualquier método estándar adecuado para una célula huésped como se conoce en la técnica. Con el fin de distinguir la transformación por células eucarióticas por ADN desnudo de plásmido o no de plásmido de la transformación por tumorigénesis celular, a menudo se denomina "transfección", y en la presente invención se usan con el mismo significado.

50 Como se usa en el presente documento, el término "nucleasas de dedos de cinc (ZFN)" se refiere a enzimas de restricción artificiales producidas por una fusión de un dominio de unión a ADN de dedos de cinc a un dominio escindido de ADN. El dominio de dedos de zinc puede manipularse para dirigirse a secuencias de ADN, y esto hace que las nucleasas de dedos de zinc se dirijan a las secuencias de ADN deseadas dentro de un genoma complejo. Puede usarse para cambiar con precisión el genoma de especies de orden superior.

55 En la presente divulgación, se usa "dominio de escisión de ADN", por ejemplo, un dominio escindido no específico derivado de la enzima de restricción FokI de tipo II se usa típicamente como un dominio de escisión de ZFN. Este dominio de escisión se debe dimerizar para escindir el ADN y, por lo tanto, se necesitan un par de ZFN para dirigirse al dominio del ADN no palindrómico. Los ZFN estándar permiten que los dominios escindidos se fusionen con el C-terminal de cada dominio de dedos de zinc. Para la dimerización de los dos dominios escindidos y el ADN escindido, los dos ZFN individuales deben separarse a una distancia limitada de sus C-terminales y unirse al ADN en la cadena opuesta. Es necesario que la secuencia de enlace más generalmente utilizada entre el dominio de dedos de cinc y el dominio escindido se separe a una distancia de 5 pb a 7 pb del borde 5' en cada dominio de unión.

60 Se adoptan algunas otras tecnologías de ingeniería de proteínas para mejorar las actividades y especificidades de los dominios de nucleasa utilizados en las ZFN. Para la producción de variantes de FokI que tienen actividades de escisión mejoradas, se adopta la evolución dirigida. Para la activación de solo las especies de heterodímeros deseadas con el fin de mejorar la especificidad escindida de FokI modificando las superficies de contacto dimerizadas, se adopta un diseño basado en la estructura.

El dominio de unión al ADN de cada uno de las ZFN tiene de 3 a 6 repeticiones de dedos de zinc y puede reconocer la distancia de 9 pb a 18 pb. Si los dominios de dedos de zinc son completamente específicos para sus áreas objetivo previstas, incluso un par de ZNF de 3 dedos, que pueden reconocer una longitud total de 18 pb, teóricamente pueden dirigirse a un solo locus en un genoma de mamífero.

Para habilitar la unión a secuencias deseadas, se han desarrollado varias estrategias para manipular el dedo de zinc Cys2His2. Incluyen tanto el ensamblaje modular como la estrategia de selección que adoptan sistemas de presentación en fagos o de selección celular.

El método más simple para producir una nueva matriz de dedos de zinc es enlazar pequeños "módulos" de dedos de zinc con especificidades conocidas. El proceso de ensamblaje modular más general implica, para la preparación de una matriz de 3 dedos capaz de reconocer áreas objetivo de 9 pb, la unión de tres dedos de zinc separados que pueden reconocer cada una de las secuencias de ADN de 3 pb. Como alternativa, un método para usar un módulo de 1 dedos o 2 dedos para preparar arreglos de dedos de zinc que tengan seis o más dedos de zinc individuales.

Se pueden usar diversos métodos selectivos para producir matrices de dedos de zinc capaces de dirigirse a las secuencias deseadas. En la etapa inicial del intento de selección, se usó la presentación en fagos para seleccionar proteínas unidas a los objetivos de ADN dados de matrices de dedos de zinc parcialmente aleatorizadas de muchos grupos. En un intento más reciente, se utilizaron sistemas de un híbrido en levaduras, sistemas de un híbrido y doble híbrido en bacterias, y células de mamíferos. Un método más prometedor para seleccionar una nueva matriz de dedos de zinc es utilizar el sistema de doble híbrido en bacterias, y se llama "ABIERTO". Este sistema utiliza la selección de una segunda ronda para obtener una matriz de 3 dedos capaz de unirse a una secuencia deseada de 9 pb, después de unir cada dedo de zinc del conjunto seleccionado por adelantado para ser seleccionado para unirse a cada triplete dado. Este sistema fue desarrollado por Zinc-Finger Consortium, como una alternativa a la fuente comercial de matrices de dedos de zinc manipuladas.

La presente invención se describe en el conjunto de las reivindicaciones.

Los presentes inventores tuvieron éxito en la preparación de líneas celulares somáticas insertadas con el gen G418 (Neo), de modo que las células somáticas con un gen CMAH inactivado se pueden seleccionar de manera eficiente al eliminar el gen CMAH involucrado en la síntesis del determinante del antígeno Neu5Gc.

El vector de direccionamiento y la línea celular para transformación preparados en la presente invención se pueden usar para la producción eficaz de cerdos clonados para xenotrasplantes, mediante la regulación compleja de la expresión de genes implicados en las respuestas de rechazo inmunológico.

El vector usado en la presente divulgación es una nueva tecnología que puede producir la proteína Fox1 que tiene una función de nucleasa para eliminar proteínas de dedo de zinc que pueden reconocer la secuencia de un gen determinante en una célula somática y genes dentro del determinante.

El vector utilizado en la presente invención tiene una eficacia y precisión mejoradas en comparación con la del vector de direccionamiento convencional.

Adicionalmente, el gen CMAH dirigido por el vector es preferiblemente el gen CMAH derivado de mamíferos, incluyendo ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, caballos, conejos, perros, monos, etc., más preferiblemente el gen CMAH derivado de cerdos, y lo más preferiblemente el gen CMAH derivado de cerdos en miniatura, pero no está limitado a los mismos.

Además, el vector de la presente divulgación incluye genes marcadores de selección positiva.

Para los genes marcadores de selección positiva, se pueden usar neomicina fosfotransferasa (Neo), higromicina fosfotransferasa (Hyg), histidinoldeshidrogenasa (hisD), puromicina (Puro), guanina fosforribosiltransferasa (Gpt), etc., y preferiblemente Neo, pero no están limitados a los mismos.

Cuando el vector de direccionamiento a genes de la presente divulgación se dirige a la célula huésped, se produce una recombinación homóloga entre el gen para sintetizar un determinante de antígeno endógeno en el genoma de la célula huésped y el vector de direccionamiento y se sustituye la secuencia de nucleótidos.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un transformante no humano que se introduce con el vector de direccionamiento anterior.

El método de transformación puede incluir cualquier método que pueda introducir cualquier molécula dada de ácido nucleico en un organismo no humano, una célula, un tejido o un órgano, y puede realizarse utilizando cualquier método estándar adecuado para una célula huésped como se conoce en la técnica. El método puede incluir electroporación, un método de precipitación con fosfato de calcio (CaPO_4), un método de precipitación con cloruro de calcio (CaCl_2),

microinyección, método de polietilenglicol (PEG), método DEAE-dextrano, un método de liposomas catiónicos, un método de acetato de litio-DMSO, etc., pero el método no se limita a estos.

Además, la presente divulgación proporciona un animal clonado no humano para ser preparado a través de un trasplante nuclear de la línea celular somática no humana para la transformación.

El animal clonado no humano puede ser posiblemente un mamífero que tenga un tamaño similar al de los seres humanos tales como ovejas, cabras, cerdos, perros, etc., preferiblemente cerdos, y entre ellos, más preferiblemente cerdos en miniatura.

El trasplante nuclear utilizado para la preparación de los animales clonados se puede realizar posiblemente utilizando un método bien conocido en la técnica, y preferiblemente los métodos descritos en los documentos US 6.781.030B, US 6.603.059B, US 6.235.969B, US 7.355.094B, US 7.071.372B, KR 862298B, KR 500412B, KR 807644B, JP 4153878B, US 6.700.037B, US 7.291.764B, US 6.258.998B, US 6.548.741B, WO 03/089632A, US 7.371.922B, etc., y para cerdos, aquellos descritos en KR500412B, KR807644, JP4153878B, US 6.700.037B, publicación de la solicitud de patente de KR No. 10-2009-0056922, US 7.291.764B, US 6.258.998B, US 6.548.741B, WO 03/089632A, y US 7.371.922B.

Además, la presente divulgación proporciona un método para producir xenoórganos para trasplante que incluye la ablación de un órgano necesario para el trasplante, después de criar los animales clonados no humanos. El órgano puede ser extirpado por la operación quirúrgica convencional después de criar animales clonados no humanos donadores mediante la regulación del período de crianza en función del sexo, la edad, el peso corporal, la altura, etc., de un sujeto receptor, y los órganos extirpados pueden ser inmediatamente trasplantados al sujeto receptor, o almacenados rápidamente en un refrigerador.

Como fuente de suministro óptima para el xenotrasplante, se consideran los cerdos miniatura que pueden suministrar órganos a gran escala debido a la similitud en el tamaño y las características fisiológicas de los humanos y su fecundidad. Para esto, primero se deben producir cerdos en miniatura que puedan controlar las respuestas de rechazo inmunológico. El éxito en el trasplante de cerdos se basa en si se puede superar o no una serie de respuestas de rechazo inmunológico (respuestas de rechazo inmunológico hiperagudas, vasculares agudas, mediadas por células y crónicas).

Según el informe anterior, el gen GT es un gen fuente que causa respuestas de rechazo inmunológico agudas durante el xenotrasplante, y cuando este gen se elimina, es posible desarrollar un modelo animal de enfermedad para el xenotrasplante en el que se eliminan las respuestas de rechazo biológico. En 2005, un órgano, derivado de un cerdo clonado en el que se eliminó el gen GT, se trasplantó a un mono, y como resultado, se informó que la supervivencia se mantuvo hasta 2 a 6 meses después del trasplante sin respuesta de rechazo inmunológico agudo (Kenji Kuwaki et al., Nature Medicine, 11 (1): 29-31, 2005). Sin embargo, se informó que, incluso con la eliminación del gen GT, puede producirse una respuesta de rechazo grave durante el trasplante de órganos mediante la activación de genes del complemento humano causada por los xenoantígenos que pueden atravesar una ruta diferente (Tanemura, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 235: 359-364, 1997; Komoda, H. et al., Xenotransplantation, 11: 237-246, 2004). Mientras tanto, se informó que el determinante del antígeno del ácido N-glicolilneuramínico (en adelante, "Neu5Gc"), que está presente en la mayoría de los mamíferos excluyendo a los humanos, también puede causar una respuesta de rechazo inmunológico durante el xenotrasplante (documento WO20061133356A; Pam Tangvoranuntakul, Proc. Natl. Acad. Soc. USA 100: 12045-12050, 2003; Barbara Bighignoli, BMC genetics, 8: 27, 2007). Neu5Gc se convierte a partir del ácido N-acetilneuramínico (en adelante, "Neu5Ac") por CMAH. Por consiguiente, es posible regular la respuesta de rechazo inmunológico agudo en cerdos donde se elimina el gen CMAH, y junto con los cerdos donde se elimina GalT, es posible desarrollar y utilizar un animal modelo de enfermedad para el trasplante de órganos durante el xenotrasplante. Según los informes anteriores (Basnet NB et al., Xenotransplantation, 17: 440-448, 2010; Lutz AJ et al, Xenotransplantation, 20: 27-35, 2013), cuando la capacidad de unión a las células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) o se examinaron los timocitos de un ratón doblemente inactivado (GalT y CMAH) y un cerdo doblemente inactivado (GalT y CMAH) y los anticuerpos naturales xenorreactivos dentro del suero sanguíneo humano, se confirmó que el ratón doblemente inactivado y el cerdo mostraron capacidades de unión reducidas en comparación con las de cerdo de control e inactivación de GalT. Estos resultados sugieren que se puede controlar la respuesta de rechazo inmunológico agudo causada por los xenoantígenos. De acuerdo con el informe anterior (Kavaler et al., FASEB J, 25: 1887-1893, 2011), se confirmó que en un ratón obeso con inactivación de CMAH, se redujo el tamaño del páncreas y el número de células secretoras de insulina por la falla de las células beta pancreáticas.

Por consiguiente, en el caso del cerdo de la presente divulgación, puede usarse como un modelo para la obesidad y la diabetes. Además, según el informe anterior (Chandrasekharan et al., Sci Transl Med., 28: 42-54), es posible que se utilice un ratón con inactivación de CMAH como modelo experimental para la distrofia muscular de Duchenne en humanos. Según estos informes, el cerdo de la presente divulgación puede usarse como modelo para la distrofia muscular.

[Efectos ventajosos de la invención]

Como se puede observar en la presente divulgación, se insertó una línea celular somática en la que se insertó el gen G418 (Neo), de modo que las células somáticas con inactivación del gen CMAH se pueden seleccionar mientras se elimina el gen CMAH involucrado en la síntesis del determinante del antígeno Neu5Gc, y el vector de direccionamiento y la línea celular para la transformación preparada por la presente divulgación se pueden usar para la producción eficiente de cerdos clonados para xenotrasplantes mediante la regulación del complejo de la expresión de los genes implicados en las respuestas de rechazo inmunológico.

Además, para eliminar la expresión de la proteína CMAH en cerdos, el vector de la presente divulgación se preparó de tal manera que el ADN del donante que incluía el factor de selección NEO para insertarse en el genoma se preparó por recombinación homóloga simultáneamente junto con el vector de direccionamiento CMAH utilizando un nucleasa de dedos de zinc (ZFN), y se confirmó que el vector de la presente divulgación tiene una eficacia de direccionamiento significativamente más alta que el vector de direccionamiento convencional, y se seleccionó un múltiplo de células somáticas de direccionamiento a CMAH utilizando la ZNF y ADN del donante, y se produjeron cerdos miniatura direccionados al gen CMAH mediante trasplante de óvulos fertilizados.

[Descripción de las figuras]

La Figura 1 es un mapa del plásmido de ZFN.

La Figura 2 es un gráfico de la actividad de ZFN.

La Figura 3 es un diagrama que ilustra el direccionamiento de ZFN del exón 8 de CMAH de cerdo, mediante los plásmidos directo e inverso de direccionamiento a ZFN.

La Figura 4 es un diagrama que muestra un mapa de ADN del donante (vector de direccionamiento a CMAH neo).

La Figura 5 es una imagen que muestra la secuencia del vector de direccionamiento a CMAH, indicado en amarillo; 5', indicado en blanco; PGK-neo-PolyA, indicado en gris; el brazo de 3', y la secuencia de pBSK- no están incluidas (el ADN se inserta en un sitio XbaI-KpnI de pBSK).

La Figura 6 es un diagrama que muestra la estrategia de cribado de células somáticas con inactivación de CMAH en cerdos.

La Figura 7 es una imagen que muestra el resultado de la transfección por el vector CMAH neo.

La Figura 8 es un diagrama que muestra las ubicaciones para la combinación de cebadores para confirmar la transfección de cerdos con inactivación de CMAH.

La Figura 9 es una imagen que muestra el resultado de la PCR que analiza la presencia de transfección de cerdos con inactivación de CMAH producidos por sustitución nuclear.

La Figura 10 muestra las imágenes de cerdos con inactivación de CMAH producidos por sustitución nuclear.

La Figura 11 muestra los resultados de la expresión de CMAH en una línea celular somática establecida en cerdos con inactivación de CMAH producidos por sustitución nuclear.

La Figura 12 muestra las imágenes de las respuestas de reconocimiento inmunológico entre un modelo de ratón con inactivación de CMAH y suero de sangre humano.

La Figura 13 muestra las imágenes de la pérdida de audición de acuerdo con el envejecimiento en un modelo de ratón con inactivación de CMAH.

[Mejor modo de llevar a cabo la invención]

En lo sucesivo, la presente divulgación se describirá en detalle con referencia a ejemplos no limitantes. Sin embargo, las realizaciones a modo de ejemplo divulgadas en este documento son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Construcción del plásmido de ZFN

El constructo de la presente divulgación incluye un promotor T7 de modo que puede ser impulsado por CMV y utilizado en la reacción de transcripción *in vitro*. Todos los ZFN tienen triple FLAG en el N-terminal. Las enzimas de restricción XhoI y XbaI se utilizan para escisión inmediatamente después del codón de parada y linealización de la plantilla para la síntesis de ARNm.

Ejemplo 2: Medición de la actividad de ZFN

La actividad de ZFN se mide mediante el ensayo del informador de MEL-1 de levadura (Doyon et al., N at Biotechnol, 2008, 26 (6): 702). La actividad de escisión de ZFN se midió antes de la inducción (0 h, barra azul) y después de la inducción de la expresión de ZFN (6 h, barra roja). El nivel de MEL-1 tiene una correlación positiva con la actividad de ZFN que produce escisión de doble cadena en el área objetivo deseada. Después de la inducción (6h), las ZFN que muestran señales > 50% en comparación con la ZFN del control positivo se consideran útiles para los experimentos de edición del genoma (incluso aquellas ZFN que muestran actividades en un estado no inducido (0h) pueden ser excelentes).

Ejemplo 3: Preparación del ADN del donante

Construcción del vector del brazo 5' de CMAH-brazo 3' de PGKneopolyA)

1) Clonación por PCR de 5'

En primer lugar, se obtuvo el brazo 5' mediante amplificación por PCR utilizando el ADN genómico de un mini cerdo miniatura Chicago junto con un cebador sentido (TCTAGACTCTCTATTTGGTGGCTCTGTTT, SEQ ID NO: 4) que incluye un sitio de restricción XbaI y un cebador antisentido (GAATTCAGGAGTTTCTTCCTTTCTGTTT, SEQ ID NO: 5) que incluye un sitio de restricción EcoRI, y luego se liga en un vector T. Se confirmó que el ADN clonado era un dominio del gen CMAH mediante secuenciación de ADN.

2) Clonación por PCR de 3'

El brazo 3' se amplificó por PCR utilizando el ADN genómico de un mini cerdo miniatura Chicago como plantilla junto con un cebador sentido (CTCGAGCCTACAACCCAGAAGTACTGCC, SEQ ID NO: 6) que incluye un sitio de restricción XhoI y un cebador antisentido (GGTACCAACAGGGACCTGCCAAGAGGCCA, SEQ ID NO: 7) que incluye un sitio de restricción KpnI, y luego se subclonó en un vector T. Se confirmó que el ADN clonado era un dominio del gen CMAH mediante secuenciación de ADN.

3) Construcción del vector del brazo 5' de CMAH-brazo 3' de PGKneopolyA

La construcción del vector del brazo 5' de CMAH-brazo 3' de PGKneopolyA se realizó por primera vez dividiendo el plásmido pKJ2 neo con EcoRI y XhoI para separar un fragmento de PGKneopolyA (aproximadamente 2 kb), y ligando el fragmento separado en el vector pbluscriptII (SK-) que se escindió con EcoRI y XhoI, obteniendo así el plásmido pBSK-PGKneopolyA. Con respecto a la unión 5', el plásmido 5 (vector T-easy) obtenido anteriormente se escindió con XbaI y EcoRI para obtener un fragmento de 789 pb, y luego el fragmento se ligó en el plásmido pBSK-PGKneopolyA, que se escindió con XbaI y EcoRI, construyendo así el plásmido pBSK-brazo 5'-PGKneopolyA. Finalmente, con respecto a la unión 3', el plásmido 3 (vector T-easy) obtenido anteriormente se escindió con XhoI y KpnI para obtener un fragmento de 763 pb, y luego se insertó en el plásmido brazo 5' de pBSK-PGKneopolyA, que se escindió con XhoI y KpnI, construyendo así el plásmido brazo 5' pBSK-brazo 3' PGKneopolyA.

Ejemplo 4: Vector de ZFN y método para transfección y selección de ADN del donante

La introducción de un vector de direccionamiento al gen en una célula somática de un cerdo en miniatura se realizó mediante electroporación como se describe a continuación. En la electroporación, las células cultivadas se recuperaron mediante tratamiento con tripsina, se suspendieron para obtener un cultivo líquido F10 con un número de células de 5×10^6 células/0,4 mL, y luego se mezclaron con 4,5 µg de vector de ADN del donante linealizado y 2,6 µg cada uno de ADN de pZFN1 y pZFN2, y la mezcla célula vector se agregó en una cubeta de 4 mm de espacio. La cubeta se instaló en un manipulador de células BTX Electro (ECM 2001) y luego se sometió a un choque eléctrica bajo condiciones de 480 V, 4 pulsos y 1 ms. Después del choque eléctrico, la cubeta se colocó en hielo durante 10 minutos, se transfirió a un cultivo líquido de 10 mL y se suspendió allí, y se inoculó en una placa de 48 pozos a una concentración de 1250 células/pozo. Después de 24 horas de la introducción del ADN, pasaron por el proceso de selección durante 11 días con 300 µg/mL de G418. Las células somáticas clonadas positivas formadas de este modo se subcultivaron usando una placa de cultivo de 24 pozos y se usaron para análisis. Las células somáticas así subcultivadas se subcultivaron usando una placa de cultivo de 12 pozos cuando eran confluentes al 90% en 3 a 4 días. Además, las células se subcultivaron en una placa de cultivo de 60 mm de 6 pozos, y una placa de cultivo de 100 mm con intervalos de 3 a 4 días, y luego se liofilizaron o utilizaron en los experimentos.

Ejemplo 5: Selección por PCR de células objetivo

El análisis por PCR para la selección de células inactivadas se realizó como se describe a continuación. Se utilizaron 100 ng del ADN genómico separado de las células como plantilla para PCR, y se amplificó el ADN usando el cebador Neo3-1 (GCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAT, SEQ ID NO: 8) y el cebador CMAH Sc AS3 (AAGACTCCCACCTTTAAAGGGTGGTGTGTAG, SEQ ID NO: 9) como cebadores junto con Takara Ex Taq. La PCR se realizó bajo las condiciones de 1 ciclo a 98°C durante 2 minutos; 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 68°C

durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 15 minutos. Después de la PCR, el ADN amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% y finalmente se confirmó la presencia/ausencia de una banda de ADN de aproximadamente 2 kb.

- 5 Los resultados de la transfección del vector CMAH neo fueron 5×10^6 células de transfección (vector CMAH neo, plásmido de ZFN), mediante el cultivo en 528 de las placas de 48 pozos, con un pasaje de 78 colonias individuales, y como resultado del análisis por PCR 64 colonias individuales, 28 se mostraron positivas en la primera PCR, y finalmente 19 se mostraron positivas en la segunda PCR.

10 [Tabla 1]

Numero de células transfectadas	Numero de colonias de G418 ^R	Numero de colonias de G418 ^R analizadas por PCR	Numero de colonias positivas para PCR
5×10^6	78	64	19

Los materiales usados en este documento son los siguientes.

Ejemplo 6: Sustitución nuclear de células somáticas.

- 15 Para sustitución nuclear, se adquirieron ovocitos de ART (Madison, WI), madurados *in vitro*, y los ovocitos se enuclearon y se trasplantaron con células donantes en las que se direccionó la inactivación (KO) de CMAH ([plásmido brazo 5' de pBSK-brazo 3' de PGKneoPolyA] y el vector de ADN de pZFN1 y pZFN2 [inactivación de CMAH]), y se realizó una fusión mediante dos estímulos eléctricos de pulso de CC a 1,2 kV/cm. Solo los ovocitos fusionados sobrevivientes fueron seleccionados y trasplantados en el oviducto de una madre sustituta como se muestra en la
- 20 Tabla 2.

[Tabla 2]

Número de los receptores	Células del donante	No. de embriones transferidos	Día de calentamiento	Comentarios
1	C3 de ZFN macho	192	1	2 vivos
2	C3 de ZFN macho	239	0	9 vivos 2 nacieron muertos
3	A5 hembra	212	0	-
4	A9 hembra	221	0	1 vivo
5	D11 macho	205	1	-
6	C5 macho	238	1	3 vivos
7	H10 hembra	246	1	-
8	B2 macho	240	1	1 con anormalidad
9	D1 hembra	257	1	2 vivos

- 25 La Tabla 2 muestra los resultados de la sustitución nuclear utilizando células KO para CMAH, en las que los números 1 y 2 indican la transfección de ZFN sin ADN del donante y los números 3 a 9 indican la transfección de ZFN junto con el ADN del donante.

Ejemplo 7: Producción de cerdos transgénicos en los que se direccionó el vector con inactivación de CMAH

- 30 Después de recoger los tejidos del oído de las crías producidas por el parto normal, el ADN genómico se extrajo utilizando el kit Miniprep de ADN genómico de mamífero GenElute^{MR} (Sigma-Aldrich). Para un análisis preciso basado en el ADN extraído, se realizó un análisis de PCR en combinación de cebadores para la región del brazo izquierdo, la región del brazo derecho y una región que incluye el brazo izquierdo y el brazo derecho, y luego se confirmó la presencia de la introducción del gen.

- 35 Combinación de cebadores del brazo derecho.

Neo 3-1 en dirección 5': TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT, SEQ ID NO: 10
ScAS3 en dirección 3': AAGACTCCCACTTTAAAGGGTGGTGTGTAG, SEQ ID NO: 11

- 40 Combinación de cebadores del brazo izquierdo.

ScS5 en dirección 5': CCCTTCCATCCCAACCGTCCTCATCCTTAC, SEQ ID NO: 12
CMAHR en dirección 3': ACTCTCTGTTTTAGGCTGCTTGTT, SEQ ID NO: 13

- 45 Combinación de cebadores de brazo derecho e izquierdo.

ScS5 en dirección 5': CCCTTCCATCCCAACCGTCCTCATCCTTAC, SEQ ID NO: 14
ScAS3 en dirección 3': AAGACTCCCACTTTAAAGGGTGGTGTGTAG, SEQ ID NO: 15

Ejemplo 8: Confirmación de la expresión de CMAH en cerdos con inactivación de CMAH

Para confirmar la presencia de la expresión de CMAH en un cerdo con inactivación de CMAH, se estableció una línea celular somática a partir de cerdos con inactivación de CMAH heterocigotos y homocigotos. Luego, las proteínas se extrajeron de las células utilizando la solución de extracto de proteína RIPA (Thermo Scientific, EE. UU.), se sometieron a un análisis de transferencia Western y, por lo tanto, se confirmó que la proteína CMAH no se expresaba en el cerdo con inactivación de CMAH homocigoto, mientras que la expresión de la proteína CMAH se redujo significativamente en el cerdo con inactivación de CMAH heterocigoto en comparación con el de un cerdo de tipo silvestre. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Ejemplo 9: Respuesta de reconocimiento inmune entre un modelo de ratón con inactivación de CMAH y suero humano

Los presentes inventores investigaron las capacidades de unión a los timocitos de un modelo de ratón con inactivación de CMAH y los anticuerpos xenorreactivos naturales de sueros humanos, la capacidad de unión entre las células derivadas de homocigotos e IgG en todos los tipos de sangre (A, B, O y AB) en los que se redujeron en comparación con las células derivadas de tipo silvestre y heterocigotos, mientras que la capacidad de unión con IgM no mostró ningún significado en tipos de sangre A, O y AB (Figura 12).

Ejemplo 10: Pérdida de audición debido al envejecimiento en un modelo de ratón con inactivación de CMAH

Los presentes inventores separaron la cóclea de un modelo de ratón con inactivación de CMAH y realizaron un análisis histológico, y como resultado, descubrieron una anomalía en el epitelio sensorial coclear en CMAH-/- viejo (Figura 13). En consecuencia, el modelo se puede utilizar como 1) un modelo de pérdida de audición de acuerdo con el envejecimiento y 2) un modelo de cicatrización de heridas.

El Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Estilo Internacional del Procedimiento de Patentes.

Certificado

Emitido de conformidad con la Regla 7.2 por las siguientes autoridades internacionales de depósito

Depositante Jin-Hee Kim

KONKUK UNIVERSITY, 120 Neungdong-ro,
Gwangjin-gu, Seoul 140-701, Corea

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
IDENTIFICACIÓN PARA LA DISTINCIÓN DADA POR EL DEPOSITANTE: Sus Scrofa (cerdo miniatura SNU) Línea celular de fibroblastos de minicerdo con inactivación de CMAH	NO DE ACCESO DADO POR LA INSTITUCIÓN INTERNACIONAL ENCARGADA DEL DEPÓSITO: KCTC 12439BP
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
EL MICROORGANISMO DESIGNADO EN I INCLUYE DOCUMENTOS QUE TIENEN LOS SIGUIENTES ÍTEMS ■ PROPIEDAD CIENTÍFICA DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
III. RECIBO Y DEPÓSITO	
SE HACE DEPÓSITO DEL MICROORGANISMO EN EL INSTITUCIÓN INTERNACIONAL PARA DEPÓSITO. RECIBIDO EL 2 DE JULIO DE 2013.	
IV. RECIBO DE LA SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
IV. INSTITUCIÓN INTERNACIONAL ENCARGADA DEL DEPÓSITO	
NOMBRE: COLECCIÓN COREANA PARA CULTIVOS TIPO, INSTITUTO COREANO DE INVESTIGACIÓN DE BIOCIENCIA Y BIOTECNOLOGÍA DIRECCIÓN: KRIBB, INSTITUTO COREANO DE INVESTIGACIÓN DE BIOCIENCIA Y BIOTECNOLOGÍA, 305-806, YESEONG-GU, GW AHAK-RO, DAEJEON	FIRMA: FIRMADO POR EL PROPIO DEPOSITARIO FIRMA: KYUNG-SOOK, BAE FECHA: 3 DE JULIO DE 2013

TRADUCCIÓN ES FIEL COPIA DEL ORIGINAL
PROPIEDAD INTELECTUAL SU

ES 2 703 056 T3

<110> Konkuk University Industrial Cooperation Corp.

<120> Vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa, animal transgénico para xenotrasplante de órganos, y método del mismo

5 <150> KR1020130047938
<151> 2013-04-30

10 <160> 9
<170> KopatentIn 1.71

15 <210> 1
<211> 793
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Brazo 5'

<400> 1

tctagactct ctatttggtg gctctgtttt attttcttcc tagctcatca ctctttgaaa	60
tgaacttatt tacttattca ttatttgctt ctttcactag aatgaatgct ccatgagagc	120
agggacctgc tttatcttgc tcgccactgt attctcagt cctagaacta cgtctggcac	180
atagtaggtg ctcaataaat atcgatcaaa tgaaagaatg agcaaacgaa caaatgaaca	240
acatgtgagg taggcatcat gattccattc aacagaggag aaaaacagac ttaaggaatt	300
gaagtgggtg agctgcattt tgatcttgac tgactccaac atccatgctc ttgaccacgg	360
tgcatctcca gagtgtaatg aacatacttt actttttatat tccaccaaaa taacaaagcc	420
atgcccattg tagtagagag ttaatcgaca gtgcccttaa aatatgcatg caccagggt	480
acaactatgc atgctgccct gtgttttcag ttggatccaa atgaattgcc gtaaacaag	540
gggggattca atgtctttga ctagtttggg atattttcct agtaaccaac ttgcaaaat	600
aaagccacta atgacaagga gctttgttct acttctgcat cactcaactg tcaattttta	660
tctcttgcaa gacttcta atctactagaac ttttggtttt ctgtgatttc tgaacagaga	720
agactaatcc aaaccctgtc attccagagg aatggaaagc ccaattcatt aaaacagaaa	780
ggaagaaact cct	793

25 <210> 2
<211> 1642
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> PGK-neo-PolyA

<400> 2

35 ---
gaattctacc gggtagggga ggcgcttttc ccaaggcagt ctggagcatg cgcttttagca 60

ES 2 703 056 T3

gccccgctgg	gcacttggcg	ctacacaagt	ggcctctggc	ctcgcacaca	ttccacatcc	120
accggtaggc	gccaaccggc	tccgttcttt	ggtggcccct	tcgcgccacc	ttctactcct	180
cccctagtca	ggaagttccc	ccccgccccg	cagctcgcgt	cgtgcaggac	gtgacaaatg	240
gaagtagcac	gtctcactag	tctcgtgcag	atggacagca	ccgctgagca	atggaagcgg	300
gtaggccttt	ggggcagcgg	ccaatagcag	ctttgctcct	tcgctttctg	ggctcagagg	360
ctgggaaggg	gtgggtccgg	gggcgggctc	aggggcgggc	tcaggggcgg	ggcgggcgcc	420
cgaaggtcct	ccggaggccc	ggcattctgc	acgcttcaaa	agcgcacgtc	tgccgcgctg	480
ttctcctctt	cctcatctcc	gggcctttcg	acctgcagcc	aatatgggat	cggccattga	540
acaagatgga	ttgcacgcag	gttctccggc	cgcttggtg	gagaggctat	tcggctatga	600
ctgggcacaa	cagacaatcg	gctgctctga	tgccgccgtg	ttccggctgt	cagcgcaggg	660
gcgcccgggt	ctttttgtca	agaccgacct	gtccgggtgc	ctgaatgaac	tgaggacga	720
ggcagcgcgg	ctatcgtggc	tggccacgac	gggcgttcct	tgcgagctg	tgctcgacgt	780
tgtcactgaa	gcgggaaggg	actggctgct	attgggcgaa	gtgccggggc	aggatctcct	840
gtcatctcac	cttgctcctg	ccgagaaaagt	attatccatc	atggctgatg	caatgcggcg	900
gctgcatacg	cttgatccgg	ctacctgcc	attcgaccac	caagcgaac	atcgcatcga	960
gcgagcacgt	actcggatgg	aagccggtct	tgtcgatcag	gatgatctgg	acgaagagca	1020
tcaggggctc	gcgccagccg	aactgttcgc	caggctcaag	gcgcgcatgc	ccgacggcga	1080
ggatctcgtc	gtgacctatg	gcgatgcctg	cttgccgaat	atcatggtgg	aaaatggccg	1140
cttttctgga	ttcatcgact	gtggccgggt	gggtgtggcg	gaccgctatc	aggacatagc	1200
gttggtacc	cgtgatattg	ctgaagagct	tggcggcgaa	tgggctgacc	gcttcctcgt	1260
gctttacggt	atcgccgctc	ccgattcgca	gcgcacgccc	ttctatcgcc	ttcttgacga	1320
gttcttctga	ggggatccgg	atccgctgta	agtctgcaga	aattgatgat	ctattaaaca	1380
ataaagatgt	ccactaaaat	ggaagttttt	cctgtcatac	tttgtaaga	agggtagaga	1440
cagagtacct	acattttgaa	tggaaggatt	ggagctacgg	gggtgggggt	ggggtgggat	1500
tagataaatg	cctgctcttt	actgaaggct	ctttactatt	gctttatgat	aatgtttcat	1560
agttggatat	cataatttaa	acaagcaaaa	ccaaattaag	ggccagctca	ttcctccac	1620
tcatgatcta	tagatccctc	ga				1642

<210> 3

<211> 769

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Brazo 3'

ES 2 703 056 T3

<400> 3

gcctacaacc cagaatttac tgcccctttg ctgggtatth cgtggaatcc caccagcag	60
acaagtatgg ctggatattt tatataacgt gtttacgcat aagttaatat atgctgaatg	120
agtgatttag ctgtgaaaca acatgaaatg agaaagaatg attagtaggg gtctggagct	180
tattttaaca agcagcctga aaacagagag tatgaataaa aaaaattaaa taccatagt	240
tgctattacc aattatgtat aatagtctta tacatctaac ttcaattcca atcactatat	300
gcttataacta aaaaacgaag tatagagcca accttctttg actaacagct cttccctagt	360
cagggacatt agctcaagta tagtctttat ttttcctggg gtaagaaaag aaggattggg	420
aagtaggaat gcaaagaaat aaaaaataat tctgtcattg ttcaaataag aatgtcatct	480
gaaaataaac tgccttacat gggaatgctc ttatttgtca ggtatattaa ggaaacaaac	540
atcaaaaatg acccaaatga actcaacaat cttatcaaga agaattctga ggtggtaacc	600
tggaacccaa gacctgagcc actcttgatc tgggtaggat gctaaaggac ccaacagaca	660
ggtttgactt gaatatttac agggaaacaaa aatgattcct gaattttttc atgtttatga	720
gaaaataaag ggcataccta tggcctcttg gcagggtccct gttggtacc	769

5 <210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 4
 tctagactct ctatttggtg gctctgtt 29

15 <210> 5
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 5
 25 gaattcagga gttcttctct ttctgttt 29

<210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador

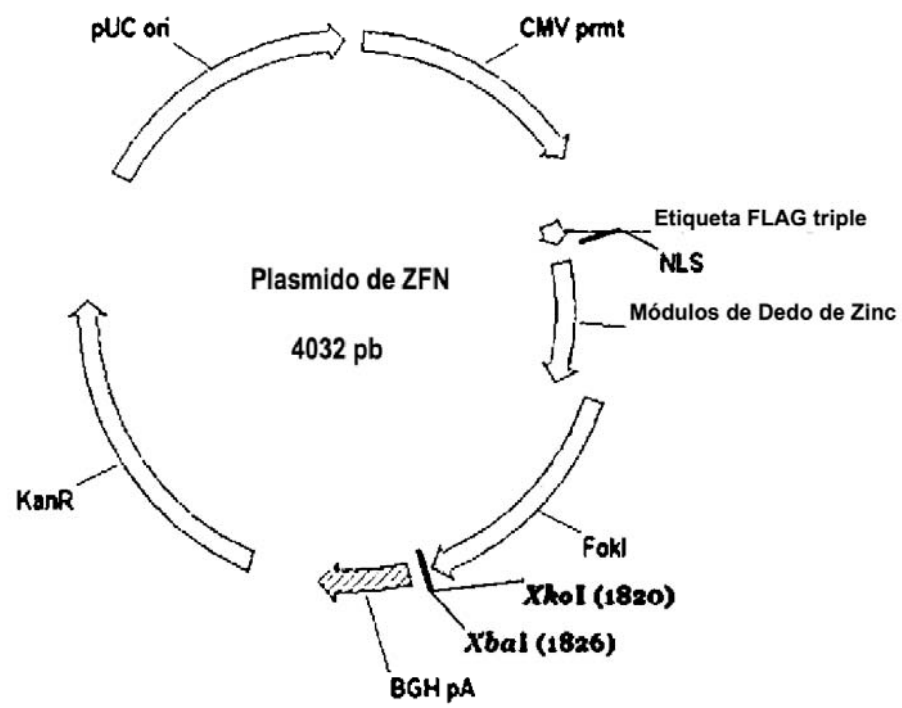
35 <400> 6
 ctcgagccta caaccagaa ttactgcc 29

	<210> 7	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 7	
10	ggtaccaaca gggacctgcc aagaggcca	29
	<210> 8	
	<211> 30	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 8	
20	gcctgctgc cgaatatcat ggtggaaaat	30
	<210> 9	
	<211> 30	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 9	
	aagactccca cttaaaggg tgggtgtgtag	30

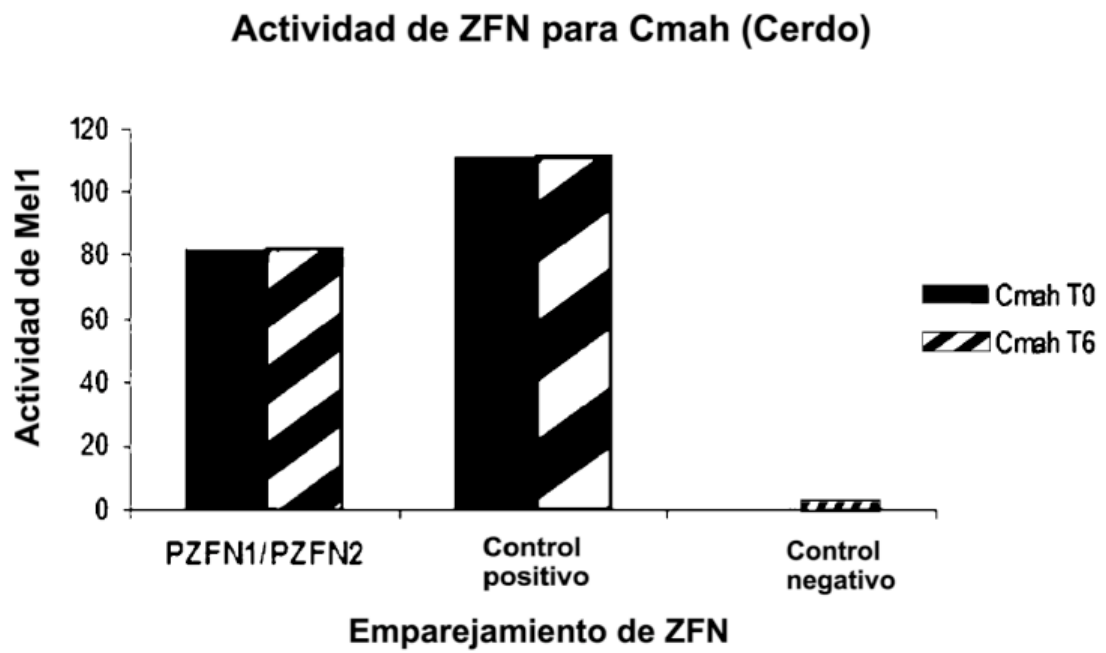
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una célula con inactivación de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa que comprende la realización de una transfección de un vector de nucleasa dedos de zinc y un vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa que comprende el brazo 5' de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa, PGKneopolyA, y el brazo 3' CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa en orden secuencial, en el que el brazo 5' de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa consiste en una secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 1, en la que la PGKneopolyA consiste en una secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 2, y en el que el brazo 3' de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa consiste en una secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 3 en las células.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el vector de direccionamiento de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa tiene un mapa de restricción representado en la Figura 4.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el vector de nucleasa de dedos de cinc tiene un mapa de restricción representado en la Figura. 1.
4. Las células con inactivación de CMP-ácido acetilneuramínico hidroxilasa preparadas de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Las células con inactivación de la reivindicación 4, que se depositaron bajo el depósito No. KCTC 12439BP.
6. Un método para fabricar animales, excluyendo seres humanos, que comprende:
 - maduración obtenida de los ovocitos no humanos a través de maduración *in vitro*;
 - enucleación de los ovocitos no humanos; trasplante de las células de la reivindicación 4 o la reivindicación 5 excluyendo células humanas en los ovocitos no humanos enucleados, y llevar a cabo una fusión entre ellos;
 - seleccionar únicamente los ovocitos fusionados sobrevivientes, en el que dichos ovocitos fusionados sobrevivientes se trasplantan en el oviducto de una madre sustituta no humana.
7. Un método para producir xenoórganos para trasplante eliminados de rechazos inmunes, que comprende:
 - criar los animales clonados, excluyendo a los humanos, fabricados por el método de la reivindicación 6, en el que los órganos deben ser extirpados de los animales clonados no humanos fabricados por el método de la reivindicación 6.

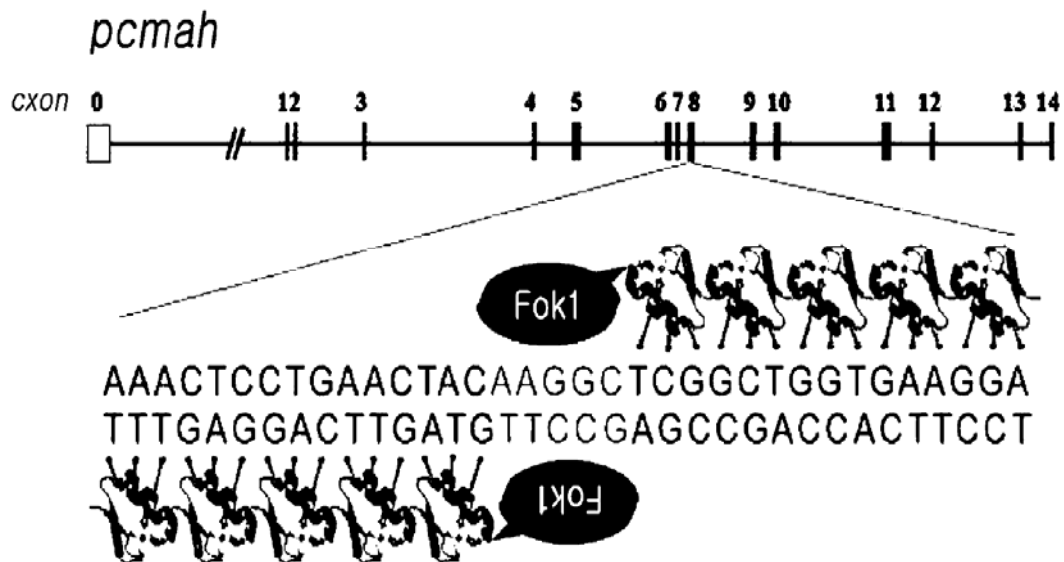
[FIG. 1]



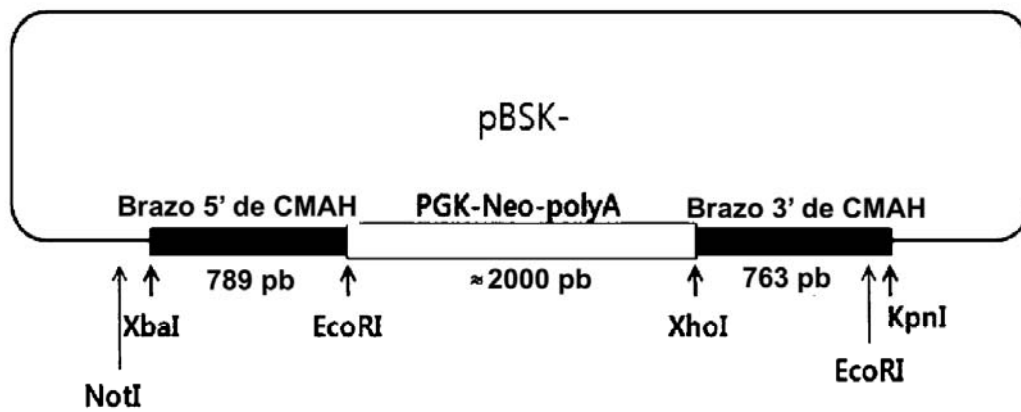
[FIG. 2]



[FIG. 3]



[FIG. 4]

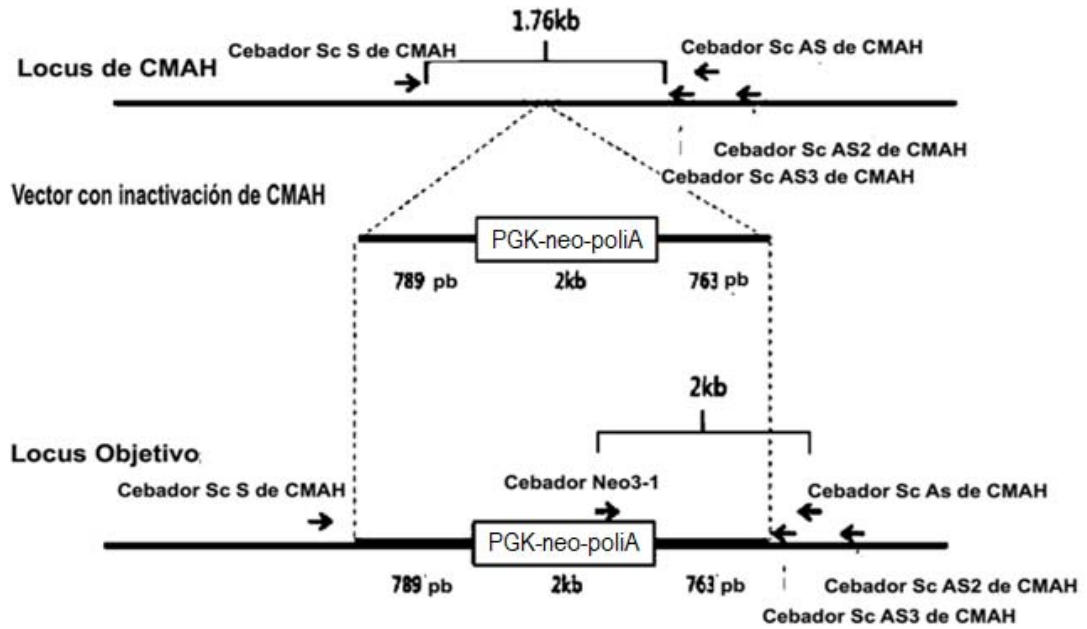


[FIG. 5]

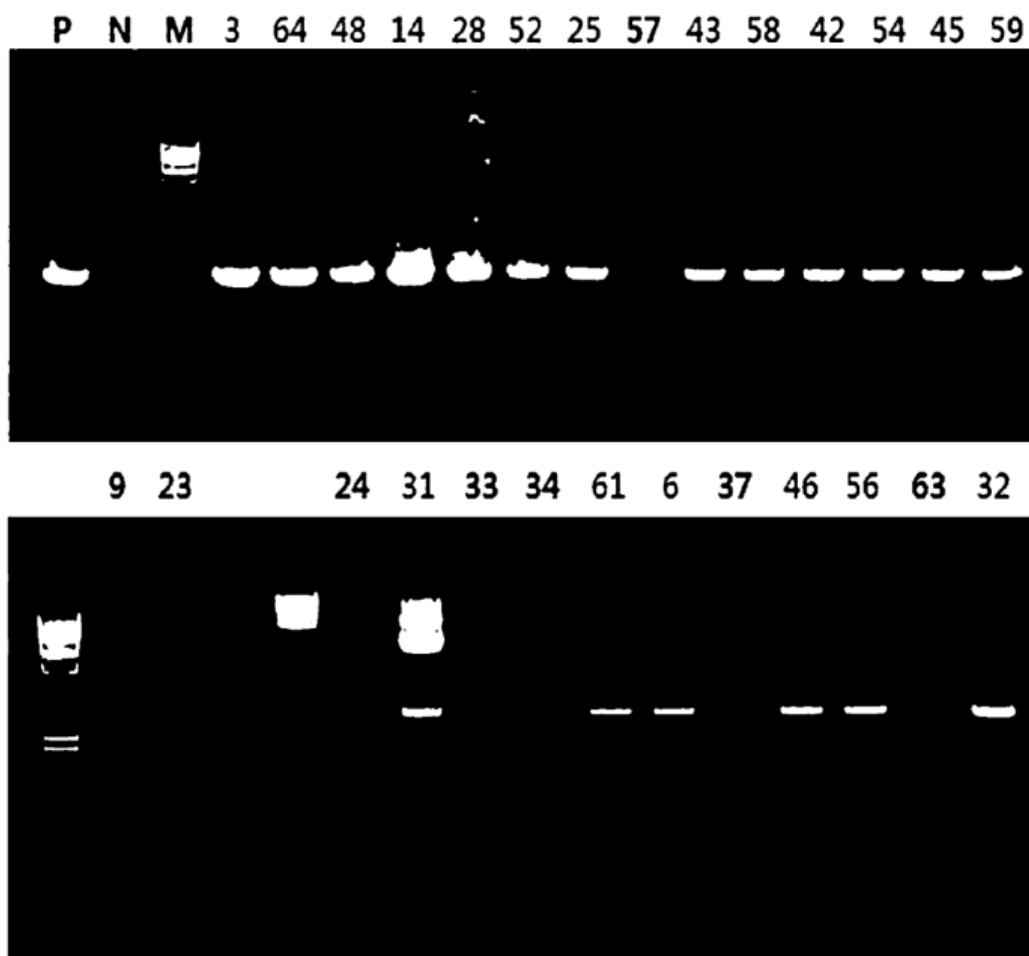
TCGTCGATGAGAGCAGGGAAGCTGCTTTATCTTGGCTGGCACTGTATTCGAGTGCGCTAGAAGTACGCTCGGCACATAGTAGGTTGCTCAATAAATATCGATCAAAAT
 AAAGAATGAGCAACAGCAACAAATGACACACATGTGAGGTAGGCATCATGATTCGATTCACACAGAGGAGGAAAAGCAGACTTAAAGGAAATTGAGTGGTGGAGCTGCAT
 TTGATCTTGACTGACTCCAGCATCCATGCTCTTGACCAAGTGCATCTCCAGAGTGTAAATGACATACCTTTGCTTTTATATTCACACCAAAATAACAAAGGCAATGC
 CGATGTTAGTAGAGAGTTAATCGACAGTGGCTTAAATATGCAATGCACCCAGGGTACAACTATGCAATGCTGGCCGTTGTCTTCAGTTGGAATCCAAAATGAATGGC
 GTAAACAAAGGGGGGGAATCAATGCTCTTGACTAGTTTGGGATATTTCGTAGTAAACAGCTTTGGCAAAATAAGGCCACTAATGACAGAGAGCTTTGTCTACTTCT
 GCATCACTCACTGTCAATTTTATCTCTTGCAAGACCTTAATCTACTAGAACCTTTGTCTTTCTGTGTATTTCTGACAGAGGAGAGCTAAATCCAAAAGCTGTCTAT
 TCCAGAGGAATGGAAAAGCCCAATTCATTTAAACAGAAAGGGAAGAACTCCTGAAATTCACCGGGTAGGGAAGGCGCTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGGCTT
 TAGACGCCCGCTGGGCATTTGGGCTACACAGTGGCTGTGGCTCGCACACATTCACATCCAGCGTAGGCGCCAAAGCGCTCGCTTCTTGGTGGCGCTT
 CGCGCGACCTTCTACTCCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCCGCCCGCGCCCGACGCTCGCTCGTGGAGGAGCTGACAAAATGGAAGTAGCAGCTCTCACTAGTCTCGTG
 CAGATGGAACAGCAACGCTGAGCAATGGAAGCGGTATGGCTTTGGGGAGCGGCCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGTCAGAGGCTGGGAAGGGGTG
 GGTCGGGGCGGCGCTCAGGGGCGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGGCCAAAGTCTCGGAGGCGCGGCAATTCGACGCTTCAAAAGCGCGAGCTCGCGCGCT
 GTCTCTCTCTCTCTCACTCTCGGGCTTGGAGCTGGAGGCAATAAGGATCGGGCAATGAACAGAGTGAATTCGACGCGAGGTTCTCGCGCGCTGGGGTGGAGAG
 GCTATTCGCTATGACTGGGCAACAAGACACATCGCTCTGATGGCGCGCTGTTCCGCTGTGAGCGCAGGGCGCGCGGCTTCTTTGTCAGAGCGGAGCTG
 TCGGTCGCTTGAATGAAGTGCAGGAGAGAGGCGAGCGGCTATTCGCTGGCTGGCGAGAGGGGCTTCTGGCGAGCTGTCTGAGAGCTTGTGACAGTGAAGGCGGGA
 GGAGCTGGCTGCTATTGGGCGAGTGGCGGGGCAAGATCTGCTGTCTCTCACTTTGCTCCTCGCGAGAGGTAATATCATCATGGCTGAATGAGTGGCGGCT
 GCATAGCTTTGATCGGCTAGCTGCGCAATTCGACACCAAGCGGAACATGCAATCGAGCGAGCAGCTACTCGAATGAAGAGCGGCTTTGCTGATCAGGATGATCTG
 GACAGAGAGCATCAGGGGCTGGCGCGAGCGAGCTGTTTCGCGAGGCTCAAGGGCGCGATGGCGGAGAGGAGTCTGCTGCTGACCGATGGGATGCTGCTTGC
 CGAATATCATGCTGGAAGAAATGGCGCTTTCTGGATTCATGAGCTGTGGCGGGTGGGTGGTGGAGGAGTGAATGAGGAGGCTCTTACTGAGAGGCTCTTACTAT
 TGCTTATGATTAATTTATAGATTTGATATCATTTTAAACAAAGCAAAACCAATTAAGGGCGAGCTCAATCTCGCACTCATGATCTATAGATCGCTCGAGGC
 TACAAAGCAGAAATTTACTGGCGCTTGTGGGTAATTCGAGGAATCCAGCGAGCAGACAGTATGGCTGGATAATTTATATAAGTGTATTAGCATAGGTTAATA
 TAGCTGAATGAGTGAATTTAGCTGTGAAGACACAGAAAAGAGAAAGATGATTAGTAGGGTCTGGAGCTTATTTAACAGAGCGCTGAAAACAGAGAGTATGA
 ATAAAAAATTAATACCATAGTGTGCTATTACCAATATGATATATAGTCTTATACATCTAAGTTCAATTCGAATTCGAATCAGTATATGCTTATCTAAAAACGAGT
 ATAGAGCGAGCTTCTTTGACTAGAGCTTCTGCTAGTCAAGGACATAGCTCAAGTATAGTCTTTATTTTCCTGGGGTAAGAAAAGAGGAATGGGAAGTAGG
 AATGCAAGAAATAAAAATTAATCTGTCTTGTGAAAAGAAATGTCATCTGAAAATAAAGTGGCTTACATGGGAATGCTCTTATTTGTGAGGATATTAAGGA
 AACCAACATCAAAATGACCCAAATGAAGTCAACATCTTATCAAGAGAAATTCGAGGTGGTAACTGGAAGCCCAAGAGCTGAGGCCCTTGTATGGTATGGA
 TGCTAAAGGACCGAACAGAGAGGTTGACTTGAATTTACAGGGAACAAAATGATTCGGAATTTTTCATGTTATGAGAAAAATAAGGGGATAGCTATGGGC
 TCTTGGCAGGTCCTGTGTGGTACG

[FIG. 6]

Estrategia de Cribado de células somáticas con inactivación de CMAH en porcino

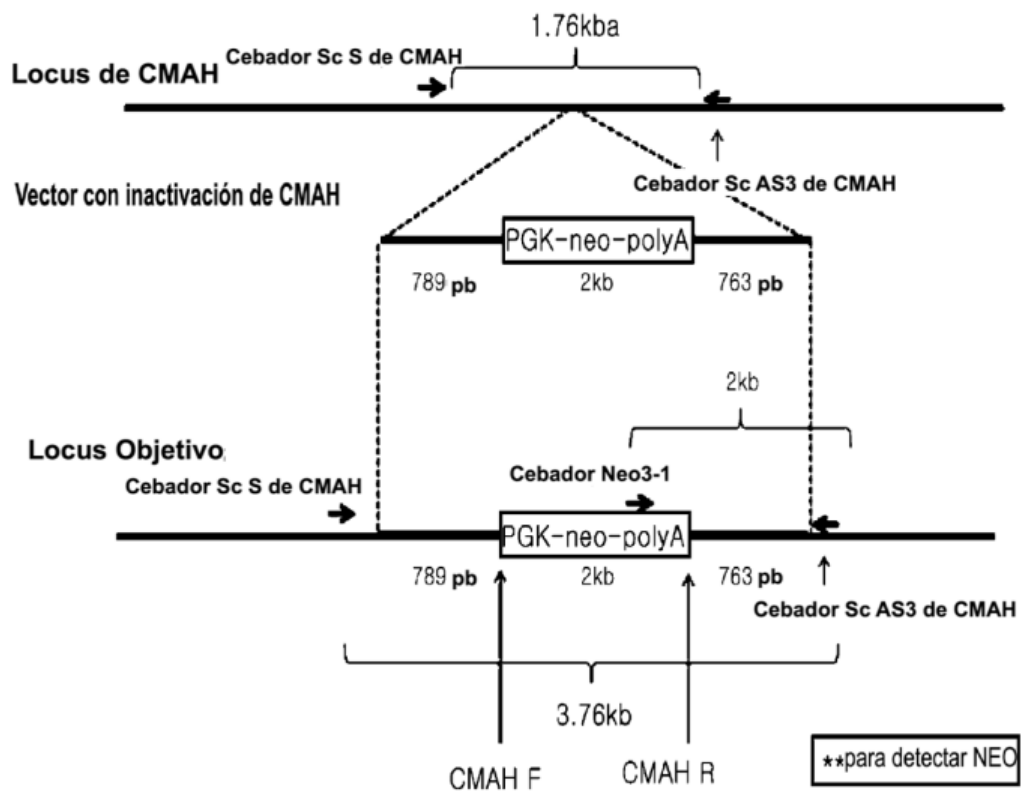


[FIG. 7]

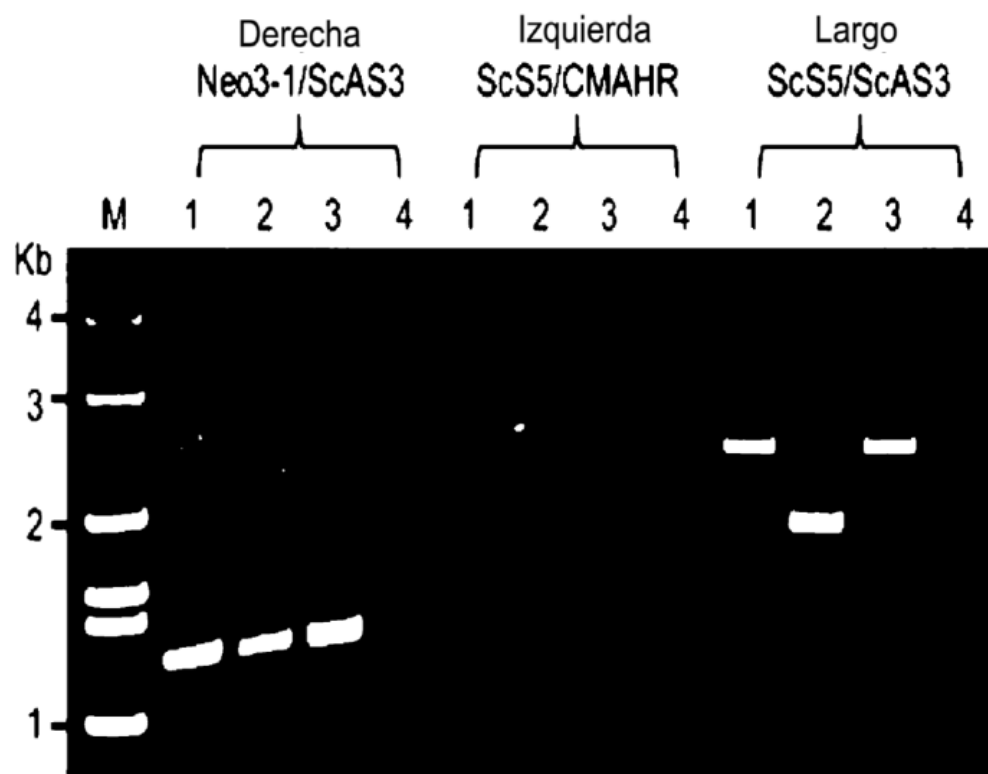


P: Control positivo, N: Control negativo, M: Marcador

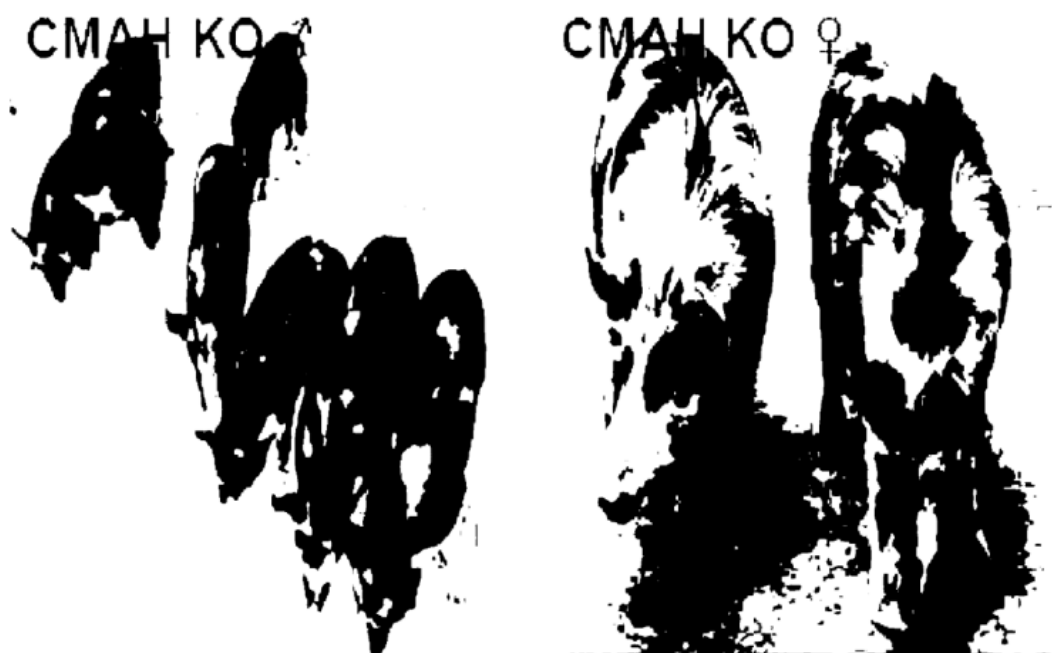
[FIG. 8]



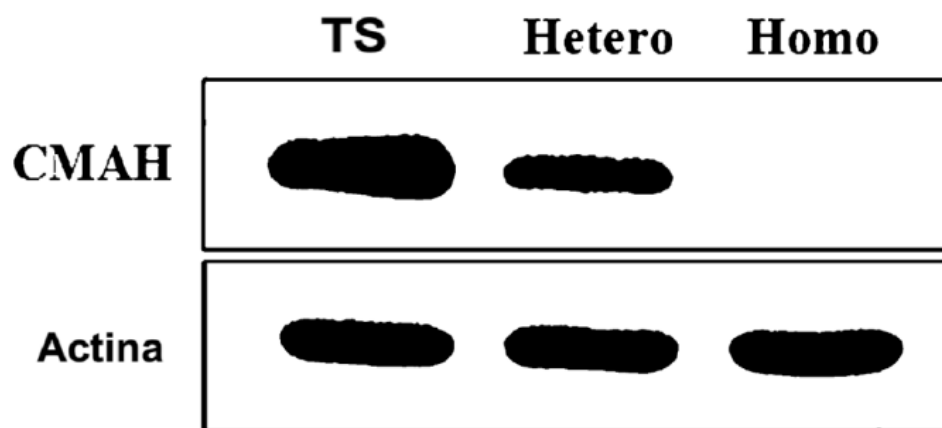
[FIG. 9]



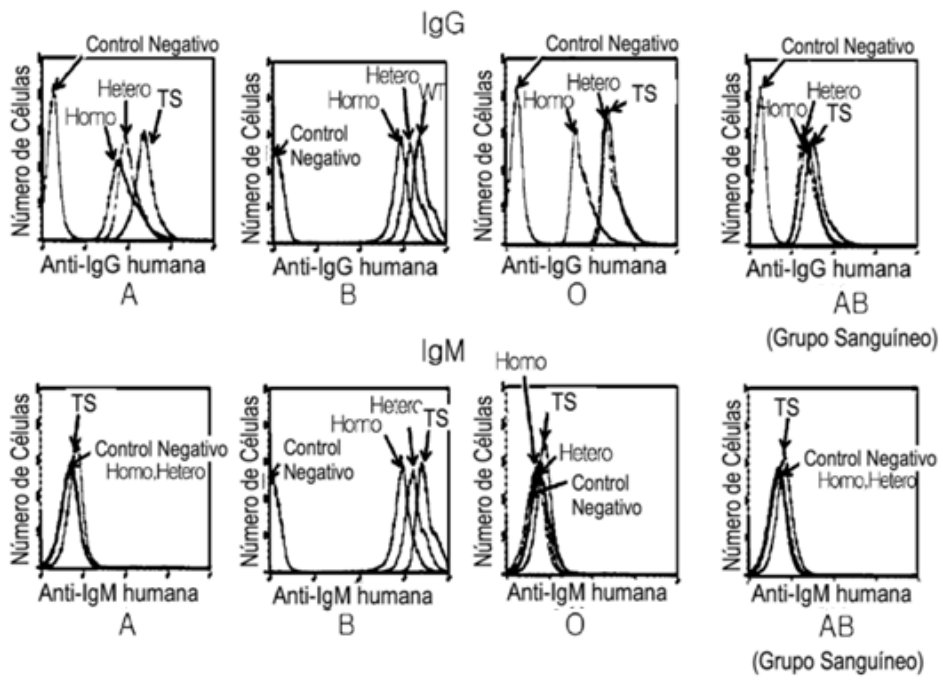
[FIG. 10]



[FIG. 11]



[FIG. 12]



[FIG. 13]

