

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 303**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2015 PCT/IB2015/058777**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075662**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2015 E 15816521 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3218490**

54 Título: **Dominio de unión a ADN del sistema CRISPR para la producción de proteínas no fucosiladas y parcialmente fucosiladas**

30 Prioridad:

**15.11.2014 IN 5767CH2014**

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

**10.05.2019**

73 Titular/es:

**ZUMUTOR BIOLOGICS, INC. (100.0%)  
100 Trade Center, Century Suites, Suite G-700  
Woburn, US**

72 Inventor/es:

**PRASAD, BHARGAV;  
UNNIKRISHNAN, DIVYA;  
HAZARIKA, JAHNABI;  
RODRIGUES, KAVITHA IYER;  
GHOSH, MALOY;  
M, PAVITHRA;  
D, PRAVIN KUMAR;  
BHATTACHARJEE, SANGHAMITRA;  
M, SATHYABALAN;  
SRINIVASAN, SANKARANARAYANAN;  
CHATTERJEE, SOHANG;  
MAITY, SUNIT;  
K, VEERESHA;  
HALAN, VIVEK;  
B. M., YOGENDRA MANJUNATH;  
HORA, ANURADHA;  
N, BAIRAVABALAKUMAR;  
NAIR, KARTHIKA;  
THANIGAIVEL, ASWINI;  
MALIWALAVE, AMOL;  
SHENOY, BHARATH R;  
PENDSE, RAJESHWARI;  
PATHAK, PRABHAT KUMAR;  
KURUP, ANISHA y  
RAO, SAHANA BHIMA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 712 303 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

Dominio de unión a ADN del sistema CRISPR para la producción de proteínas no fucosiladas y parcialmente fucosiladas

5 **Campo técnico**

La presente divulgación pertenece al campo de la biotecnología, la ingeniería genética y la inmunología. Particularmente, la presente divulgación se refiere al desarrollo de líneas celulares en las que se modifican las vías biológicas específicas. Tales modificaciones están en las enzimas de la célula, en particular, las enzimas implicadas en la glucosilación de proteínas. La presente divulgación desarrolla sistemas de expresión de proteínas en los que se logra la modificación de la cadena de glicano de la proteína. La modificación específica de la cadena de glicano produce proteínas parcialmente fucosiladas y no fucosiladas, que incluyen anticuerpos. Tales productos se usan en el desarrollo de fármacos y biomarcadores, y en diagnóstico y pronóstico de enfermedades. La presente divulgación emplea la tecnología de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular (CRISPR, del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*).

**Antecedentes y técnica anterior de la divulgación**

20 La glucosilación en eucariotas se ha estudiado a fondo durante décadas como el mecanismo de modificación covalente postraduccional de proteínas. Se predice que aproximadamente el 1-2 % del transcriptoma humano (aproximadamente 250-500 glucógenos) traduce las proteínas que son responsables de la glucosilación (Campbell y Yarema 2005). La glucosilación de las proteínas celulares desempeña muchas funciones importantes tales como el plegamiento y la estabilidad de la proteína, el tráfico intracelular e intercelular, la interacción célula-célula y célula-matriz.

30 Hay cuatro grupos diferentes de glucoproteínas: N-ligadas, O-ligadas, glucosaminoglicanos y proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol. La glucosilación N-ligada tiene lugar a través del nitrógeno de la amida de la cadena lateral de los restos de asparagina, mientras que la glucosilación O-ligada usa el átomo de oxígeno en la cadena lateral de los restos de serina o treonina. La glucosilación N-ligada tiene lugar en la secuencia de aminoácidos de Asn-X-Ser/Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido salvo prolina y ácido aspártico (Helenius y Aebi 2004).

35 La fucosa (6-desoxi-L-galactosa) es un monosacárido que está presente en muchas glucoproteínas y glucolípidos presentes en vertebrados, invertebrados, plantas y bacterias. La fucosilación es el proceso de transferencia de un resto de fucosa a diversas proteínas y oligosacáridos. La fucosilación está regulada por varias moléculas, incluyendo fucosiltransferasas, enzimas sintéticas de guanosina difosfato (GDP)-fucosa, y transportador(es) de GDP-fucosa. Un gran número de glucoproteínas fucosiladas son proteínas secretoras o proteínas de membrana sobre la superficie celular.

40 Existen 14,1 millones de casos nuevos de cáncer, 8,2 millones de muertes por cáncer y 32,6 millones de personas que viven con cáncer (dentro de los 5 años de diagnóstico) en 2014 en todo el mundo. La elevada tasa de mortalidad del cáncer sirve como un recordatorio de la necesidad de terapias más eficaces. El cambio más destacable en el desarrollo de fármacos de oncología en los últimos 20 años ha sido el desplazamiento de los citotóxicos clásicos a fármacos que afectan a las vías de señalización implicadas en el cáncer, conocidos como "anticuerpos monoclonales" o mAb. Hace una década, solo había dos mAb en el mercado y actualmente hay aproximadamente 30 mAb aprobados por la FDA de diversas modalidades terapéuticas, como Adalimumab, Infliximab, Rituximab etc. Los mAbs son el segmento de crecimiento más rápido en la industria farmacéutica y se espera que esta rápida expansión continúe. Hay más de 100 fármacos biológicos basados en anticuerpos monoclonales en ensayos clínicos. Muchos de estos están en ensayos de fase II y de fase III y se presentarán ante las agencias reguladoras para su aprobación. La mejora de medicamentos de anticuerpos monoclonales a través de las tecnologías descritas en el presente documento allanará el camino para un mejor resultado clínico para los pacientes.

55 El anticuerpo IgG1 humano es una glucoproteína altamente fucosilada. Dos oligosacáridos biantenarios N-ligados que consisten en un núcleo de heptasacárido con adición variable de fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina de bisección y ácido siálico están presentes en el Asn-297 del IgG1. La glucosilación del anticuerpo lleva a funciones biológicas únicas conocidas como "funciones efectoras" - citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, del inglés *Complement Dependent Cytotoxicity*). La ADCC es un sistema inmunitario mediado por células en donde las células inmunitarias (como células citolíticas naturales) lisan las células diana identificadas a través de anticuerpos frente a antígenos de superficie celular.

65 La función efectora de la molécula de IgG se define mediante la interacción de la región la región Fc del anticuerpo con receptores del leucocito, conocido como FcγRs, o interacciones con componentes del complemento. La composición de la estructura del oligosacárido es, de manera crítica, importante para la función efectora a través de la unión de FcγR (Shields et al. 2002; Shinkawa et al. 2003; Niwa et al. 2004; Niwa, Shoji-Hosaka, et al. 2004;

- Yamane-Ohnuki et al. 2004:). El análisis de la estructura cristalina de la IgG1 humana ha revelado la interacción intrincada de las cadenas de oligosacáridos con el dominio CH2 (Harris et al. 1998; Radaev et al. 2001). La eficacia del mecanismo de ADCC es considerablemente dependiente del nivel de fucosilación del anticuerpo. Cuanto menor es la fucosilación, mayor es la tasa de ADCC. Por lo tanto, la pérdida de fucosilación tiene consecuencias biológicas significativas. La pérdida podría deberse a las enzimas no funcionales de fucosiltransferasa, dando como resultado la no fucosilación de proteínas celulares. La ausencia de fucosa de la N-acetilglucosamina principal da como resultado el anticuerpo IgG1 que tiene una elevada afinidad de unión por el receptor FcγRIIIa, con el consecuente aumento de 50 - 100 veces mayor eficacia de ADCC. La mejora de ADCC con IgG no fucosilada es directamente proporcional a la elevada afinidad por FcγRIIIa, lo que permite que la Fc de la IgG no fucosilada supere la competición de las altas concentraciones de IgG fucosilado en suero normal. La razón plausible para la elevada afinidad de la Fc de la IgG no fucosilada por FcγRIIIa puede ser la reducción o la ausencia de inhibición estérica en la zona de contacto receptor-ligando (Harris, 1998; Radaev, 2001).
- En el sistema de expresión de mamíferos, la enzima α1,6-fucosiltransferasa codificada por el gen Fut8 es responsable de la transferencia del resto de fucosa desde la GDP-fucosa a la N-acetilglucosamina de la cadena de N-glicano en proteínas (Miyoshi, 1999). La alteración de esta función génica a través de diversos medios lleva a la producción de proteínas no fucosiladas, que incluyen anticuerpos (Naoko Yamane-Ohnuki, 2004).
- La GDP-D-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) es un miembro de la subfamilia modificadora de azúcar de los nucleótidos de la familia de deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR) (Webb, Mulichak et al. 2004).
- En sistemas de expresión en mamíferos, la GDP-fucosa, un sustrato esencial de la fucosilación, se sintetiza en el citoplasma a través de las vías *de novo* y de rescate. En la vía de fucosilación *de novo*, se sintetiza GDP-fucosa a través de la conversión de GDP-manosa a GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa, catalizado por la enzima GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD). Esta GDP-fucosa se transporta después a dentro del golgi y se usa como un sustrato para la fucosilación de proteína por la enzima α1-6 fucosiltransferasa (FUT8). La enzima transfiere el resto de fucosa desde la GDP-fucosa a la N-acetilglucosamina de la cadena de N-glicano (Miyoshi, 1999). Estas enzimas críticas, GDP-manosa 4,6-deshidratasa y α1-6 fucosiltransferasa están codificadas por los genes GMD y FUT8, respectivamente.
- Las formas no fucosiladas de los anticuerpos terapéuticos desarrollados en soportes de mamíferos, en los que la biosíntesis de fucosa está alterada, pueden tener una ventaja clínica sobre las formas fucosiladas debido a una eficacia mejorada de ADCC frente a las células tumorales diana.
- Históricamente, los sistemas de inactivación génica dependían por completo de la mutación, delección y/o inserción mediadas por recombinación homóloga (HR, del inglés *homologous recombination*). El sistema de HR, aunque es muy específico, es altamente ineficaz, ya que se necesitan cribar miles de clones para encontrar un clon mutado. Por otra parte, la delección de variaciones alélicas podría llevar más tiempo e incluso un cribado mucho mayor. En la última década han evolucionado múltiples tecnologías para lograr una modificación génica dirigida usando una combinación de un dominio de reconocimiento de secuencia de ADN y un dominio nucleasa. Estos sistemas son altamente eficientes en la identificación de sitios específicos de interés y la introducción posterior de roturas en la cadena de ADN. La rotura de ADN de cadena doble (DBS, del inglés *DNA double-strand break*) en el locus genómico dirigido activa la reparación del ADN, que se utiliza para la modificación de genes. La respuesta al daño del ADN está altamente conservada en células eucariotas. El concepto de diseño del genoma basado en DSB es altamente transferible entre organismos altamente diversos. La creación de una rotura de cadena doble aumenta la frecuencia de inactivación génica en loci dirigidos en miles de veces a través de mecanismos de recombinación homóloga y de unión de extremos no homólogos.
- La nucleasa con dedos de zinc (ZFN, del inglés *Zinc Finger Nuclease*) es una de las técnicas más frecuentemente usadas para la alteración génica. Requiere tres bases a nivel de ADN para cada matriz en tándem de dedos de zinc. Por otra parte, el solapamiento del sitio diana y la interferencia entre los dedos individuales en una matriz de dedos de zinc complica considerablemente la producción de ZFN específicos de secuencia. Adicionalmente, el principal inconveniente de los ZFN incluye un proceso de selección experimental elaborado y lento para identificar los motivos de ZFN para el reconocimiento de secuencias de ADN específicas.
- Existen métodos en la técnica anterior para la alteración de los loci genómicos Fut8 y GMD. Sin embargo, ninguno de los métodos dirige la localización específica en los loci genómicos de FUT8 y GMD mediante la tecnología CRISPR.
- Ronda *et al* 2014 *Biotechnology and Bioengineering* 111: 1604-1616 trata una herramienta basada en la red para su uso en la modificación del genoma en células CHO usando CRISPR Cas9 y CRISPy.
- Malphettes *et al* 2010 *Biotechnology and Bioengineering* 106: 774-783 trata la delección de Fut8 en líneas celulares CHO usando nucleasas de dedos de zinc y la producción de anticuerpos no fucosilados.
- El documento WO 2013/013013 se refiere a composiciones y métodos para producir glucoproteínas que tienen una estructura de glucano alterada.

El documento WO 03/035835 describe una variante de línea celular de CHO, las células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono enlazados a Asn(297).

5 Kanda *et al* 2007 J Biotech 130: 300-310 trata el establecimiento de una línea celular de inactivación de GMD.

El documento WO 2015/010114 trata un método y composiciones que utilizan el sistema CRISPR para alterar un gen diana en células eucarióticas para producir inactivaciones dobles de alelos.

10 El documento WO 2015/052231 describe un sistema que permite la modificación múltiple de secuencias de ácido nucleico tales como secuencias genómicas.

La presente divulgación supera las desventajas o limitaciones asociadas con los métodos de la técnica anterior usando la tecnología CRISPR para dirigir una localización específica en el loci genómico FUT8 o el loci genómico GMD, que da como resultado una alteración completa del gen y la función relacionada, proporcionando una célula que produce proteínas no fucosiladas.

15

### **EXPOSICIÓN DE LA DIVULGACIÓN**

20 La invención es tal como se define en las reivindicaciones y proporciona:

En un primer aspecto: Un dominio de unión a ADN del sistema CRISPR, en el que el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de ARN transcrita a partir de la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 y combinaciones de las mismas;

25 En un segundo aspecto: Un complejo CRISPR-nucleasa que comprende el dominio de unión a ADN de acuerdo con el primer aspecto y nucleasa;

En un tercer aspecto: Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de unión a ADN de acuerdo con el primer aspecto;

30 En un cuarto aspecto: Una célula que comprende un vector de acuerdo con el tercer aspecto;

En un quinto aspecto: Un procedimiento *in vitro* de obtención de una célula de inactivación de fucosa, comprendiendo dicho método las etapas de:

35 Obtener una construcción CRISPR-nucleasa que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de unión a ADN de acuerdo con el primer aspecto; y

Transfectar una célula con la construcción de la etapa (a) para obtener una célula de inactivación de fucosa, en la que la construcción CRISPR-nucleasa proporciona el complejo CRISPR-nucleasa que comprende el dominio de unión a ADN y nucleasa; y en donde el complejo escinde la secuencia del gen GMD en la célula;

40 En un sexto aspecto: Un método *in vitro* de obtención de proteína con fucosilación que varía del 0 % al 100 %, comprendiendo dicho método las etapas de:

45 a) Cultivar la célula obtenida mediante el método de acuerdo con el quinto aspecto, en donde la célula tiene actividad de fucosilación que varía del 0 % al 100 %; y

b) Obtener la proteína expresada por la célula de la etapa (a).

La presente divulgación se refiere a un dominio de unión a ADN del sistema CRISPR, en donde el dominio de unión a ADN comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 a la SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 a la SEQ ID NO: 93 y combinaciones de los mismos; un complejo CRISPR-nucleasa que comprende el dominio de unión a ADN tal y como se menciona anteriormente y nucleasa; un vector que comprende un dominio de unión a ADN tal como se menciona anteriormente; una célula que comprende un vector tal como se mencionó anteriormente; un método de obtención de una célula de inactivación de fucosa, comprendiendo dicho método las etapas de a) Obtener una construcción CRISPR-nucleasa, y b) Transfectar una célula con la construcción de la etapa (a) para obtener una célula de inactivación de fucosa; un método de obtención de proteína con fucosilación que varía del 0 % al 100 %, comprendiendo dicho método las etapas de - a) Obtener una construcción CRISPR-nucleasa, b) Transfectar una célula con la construcción de la etapa (a) para obtener una célula con actividad de fucosilación que varía del 0% al 100 % y c) Obtener la proteína expresada por la célula de la etapa (b); una proteína con fucosilación del 0 % al 100 %, obtenido por el método tal como se menciona anteriormente; y una composición que comprende la proteína tal como se menciona anteriormente, opcionalmente junto con excipiente farmacéuticamente aceptable.

60

### **Breve descripción de las figuras adjuntas**

65 La **Figura 1A** representa la secuencia codificante del gen Fut8 y la secuencia de la proteína.

La **Figura 1B** representa la organización del gen GMD.

La **Figura 2A** representa la secuencia de aminoácidos de Fut8 en CHOK1.

La **Figura 2B** representa la secuencia de aminoácidos completa del gen GMD.

5 La **Figura 3A** representa el mapa de construcción para el ARNg de la construcción del vector de CRISPR/Cas pD1401.

La **Figura 3B** representa la secuencia diana del exón 7 de Fut8.

La **Figura 4A** representa la construcción CRISPR/Cas de GMD pD1401 (ARNg 167-207) que se dirige al Exón 3 del gen GMD.

10 La **Figura 4B** representa la construcción CRISPR/Cas de GMD pD1301 (ARNg 404) que se dirige al Exón 4 del gen GMD.

La **Figura 4C** representa la secuencia diana del exón 3 de GMD.

La **Figura 4D** representa la secuencia diana del exón 4 de GMD.

La **Figura 5** representa las células CHOK1 de control y las líneas celulares clonales de CHOK1 transfectadas con la construcción CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al gen Fut8, observadas en el día 1.

15 La **Figura 6A** representa las células CHOK1 de control y las líneas celulares de CHOK1 transfectadas con la construcción CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al gen Fut8, observadas en el día 4.

La **Figura 6B** representa las líneas celulares de CHOK1 transfectadas con la construcción CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) que se dirige al exón 3 del gen GMD.

20 La **Figura 7A** representa el ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al exón 7 de FUT8.

La **Figura 7B** representa el ensayo de citometría de flujo de las células CHOK1 clonales transfectadas con las construcciones de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) o pD1301 (ARNg 404) o pD1401 (ARNg 167-207) + pD1301 (ARNg 404) que se dirigen al exón 3 y/o al exón 4 de GMD.

25 La **Figura 7C** representa el ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) que se dirige al exón 3 de GMD.

La **Figura 8A** representa el perfil de fluorescencia en el ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al exón 7 de FUT8.

30 La **Figura 8B** representa el perfil de fluorescencia en el ensayo de citometría de flujo de las células CHOK1 clonales transfectadas con las construcciones de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) o pD1301 (ARNg 404) o pD1401 (ARNg 167-207) + pD1301 (ARNg 404) que se dirigen al exón 3 y/o al exón 4 de GMD.

La **Figura 8C** representa el perfil de fluorescencia en el ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) que se dirige al exón 3 de GMD.

35 La **Figura 9A** representa el locus genómico del exón 7 de Fut 8, la respectiva secuencia de aminoácidos, motivos importantes de la enzima como la cadena beta 2 y la hélice 3H2 y la secuencia de reconocimiento CRISPR.

La **Figura 9B** representa el locus genómico del exón 3 y el exón 4 de GMD, la correspondiente secuencia de aminoácidos y las secuencias de reconocimiento de CRISPR.

40 La **Figura 10** representa el ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al exón 7 de FUT8.

La **Figura 11** representa el perfil de fluorescencia en el ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al exón 7 de FUT8.

45 La **Figura 12** representa el ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al exón 7 de FUT8.

La **Figura 13A a 13C** representan la curva de crecimiento de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al exón 7 de FUT8.

50 La **Figura 14** representa la comparación de las células CHOK1 clonales transfectadas con la construcción de CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553) que se dirige al exón 7 de FUT8 del ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC y Strep-FITC.

La **Figura 15A** representa la figura representativa del producto amplificado por PCR del clon de Fut8 en CRISPR/Cas (CR1-KI-T1 n.º 022) cuando corre en gel de agarosa al 1 %.

55 La **Figura 15B** representa la figura representativa del producto amplificado por PCR del clon de GMD en CRISPR/Cas (GMD\_1.12 y GMD\_1.27) cuando corre en gel de agarosa al 1 %.

La **Figura 15C** representa la ejecución representativa en gel de agarosa al 1 % con amplificación por PCR de ADN genómico de la línea celular clonal GMD 2.30 con cebadores específicos para el locus del exón 4 de GMD.

60 Las **Figuras 16A a 16C** representan la digestión por enzimas de restricción representativas del producto amplificado por PCR en el vector pTZ57R/T para confirmar la presencia de inserciones de diferentes líneas celulares de inactivación.

Las **Figuras 17A a 17G** representan la alineación representativa de la secuencia de ADN genómico en los clones de líneas celulares de inactivación de FUT8 que presentan delección en la secuencia génica de FUT8 en el exón 7.

65 Las **Figuras 17H a 17L** representan las alineaciones de la secuencia de nucleótidos con líneas celulares clonales de inactivación de GMD.

Las **Figuras 18A y 18B** representan la construcción CRISPR/Cas de FUT8, pD1401 (ARNg 514-553), que da

como resultado la delección, codones de parada prematura en el locus diana del exón 7 de FUT8.

La **Figura 18C** representa la construcción CRISPR/Cas de GMD, pD1401 (ARNg 167-207), que da como resultado la delección, codones de parada prematura y mutaciones de desplazamiento del marco en el locus diana del exón 3 de GMD.

5 La **Figura 18D** representa la construcción CRISPR/Cas de GMD, pD1401 (ARNg 167-207), que da como resultado la inserción, codones de parada prematura y mutaciones de desplazamiento del marco en el locus diana del exón 3 de GMD.

La **Figura 18E** representa la construcción CRISPR/Cas de GMD, pD1401 (ARNg 167-207), que da como resultado la inserción, codones de parada prematura en el locus diana del exón 3 de GMD.

10 La **Figura 18F** representa la construcción CRISPR/Cas de GMD, pD1301 (ARNg 404), que da como resultado la inserción, codones de parada prematura y mutaciones de desplazamiento del marco en el locus diana del exón 4 de GMD.

La **Figura 18G** representa que la línea celular transfectada con ambas construcciones CRISPR/Cas de GMD, pD1301 (ARNg 404) y pD1401 (ARNg 167-207) revelan la delección de los aminoácidos en el locus del exón 4 y el locus del exón 3 permaneció sin cambios.

15 La **Figura 19** representa la comparación de la secuencia de aminoácidos de FUT8 en varios eucariotas.

La **Figura 20** representa la eficacia de la transfección de la línea celular CHOK1 usando diferentes protocolos.

### Descripción detallada de la divulgación

20 La presente divulgación se refiere a un dominio de unión a ADN del sistema CRISPR, en donde el dominio de unión a ADN comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 a la SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 a la SEQ ID NO: 93 y combinaciones de las mismas.

25 En una divulgación, la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 17 a la SEQ ID NO: 37 se unen a la secuencia del gen Fut8; y la SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 47 a la SEQ ID NO: 93 se unen a la secuencia del gen GMD.

30 En otra divulgación, la SEQ ID NO: 13 transcribe a la SEQ ID NO: 14; la SEQ ID NO: 15 transcribe a la SEQ ID NO: 16; la SEQ ID NO: 37 transcribe a la SEQ ID NO: 38; la SEQ ID NO: 39 transcribe a la SEQ ID NO: 40; la SEQ ID NO: 41 transcribe a la SEQ ID NO: 42; la SEQ ID NO: 43 transcribe a la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 45 transcribe a la SEQ ID NO: 46.

35 La presente divulgación también se refiere a un complejo CRISPR-nucleasa que comprende el dominio de unión a ADN tal y como se menciona anteriormente y nucleasa.

En una divulgación, la nucleasa es endonucleasa Cas9.

40 En una divulgación, la nucleasa es endonucleasa Cas9n.

La presente divulgación también se refiere a un vector que comprende el dominio de unión a ADN tal y como se menciona anteriormente.

45 En una divulgación, el vector comprende adicionalmente una secuencia que codifica la nucleasa.

La presente divulgación también se refiere a una célula que comprende un vector tal como se menciona anteriormente.

50 En una divulgación, la célula se selecciona del grupo que consiste en COS, CHO-S, CHO-K1, CHO-K1 GS (-/-), CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV, VERO, MDCK, W138, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NSO, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293-F, HEK293-H, HEK293 -T, YB23HL.P2.G11.16Ag.20, perC6, célula de hibridoma productora de anticuerpos, célula madre embrionaria, célula Namalwa, línea celular de insecto de *Spodoptera fugiperda* (Sf), Pichia, Saccharomyces y Schizosaccharomyces.

55 La presente divulgación también se refiere a un método de obtención de una célula de inactivación de fucosa, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) Obtener una construcción de CRISPR-nucleasa; y

60 b) Transfectar una célula con la construcción de la etapa (a) para obtener una célula de inactivación de fucosa.

La presente divulgación también se refiere a un método de obtención de proteína con fucosilación que varía del 0 % al 100 %, comprendiendo dicho método las etapas de:

65 a) Obtener una construcción de CRISPR-nucleasa;

b) Transfectar una célula con la construcción de la etapa (a) para obtener una célula con actividad de

fucosilación que varía del 0% al 100 %; y  
 c) Obtener la proteína expresada por la célula de la etapa (b).

- 5 En una divulgación, la construcción CRISPR-nucleasa proporciona el complejo tal como se menciona anteriormente; y el complejo escinde la secuencia génica en la célula, dicho gen seleccionado del grupo que consiste en Fut8, GMD y combinaciones de los mismos.
- 10 En otra divulgación, la secuencia del gen Fut8 que codifica la enzima  $\alpha$ -1,6 Fucosiltransferasa se escinde en el Exón 7.
- 15 En otra divulgación más, la secuencia del gen GMD que codifica la enzima  $\alpha$  GDP-D-manosa 4,6-deshidratasa se escinde en el exón seleccionado del grupo que consiste en el Exón 3, el Exón 4 y una combinación de los mismos.
- 20 En otra divulgación más, la célula se selecciona del grupo que consiste en COS, CHO-S, CHO-K1, CHO-K1 GS (-/-), CHO-DG44, CHO -DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV, VERO, MDCK, W138, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T, YB23HL.P2.G11.16Ag.20, perC6, célula de hibridoma productora de anticuerpos, célula madre embrionaria, célula Namalwa, línea celular de insecto de *Spodoptera fugiperda* (Sf), Pichia, Saccharomyces y Schizosaccharomyces.
- 25 En otra divulgación más, la proteína está fucosilada al 0 %, y la proteína se obtiene por alteración del gen Fut8 en la célula.
- En otra divulgación más, la proteína tiene del 0 % al 100 % de fucosilación, y la proteína se obtiene por alteración del gen GMD en la célula; y el método comprende además la adición de L-Fucosa en medio de cultivo.
- 30 En otra divulgación más, la proteína es un anticuerpo.
- En otra divulgación más, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 35 En otra divulgación más, la célula produce una proteína endógena.
- En otra divulgación más, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa de introducción de un gen que codifica una proteína en la célula y la obtención de la proteína.
- 40 La presente divulgación también se refiere a una proteína con fucosilación del 0 % al 100 %, obtenido por el método tal como se menciona anteriormente.
- En una divulgación, la proteína es un anticuerpo.
- 45 La presente divulgación también se refiere a una composición que comprende la proteína tal y como se menciona anteriormente, opcionalmente junto con excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En una divulgación, la proteína es un anticuerpo.
- 50 La presente divulgación se refiere a la producción de proteínas no fucosiladas, incluyendo anticuerpos no fucosilados, a partir de la célula.
- La presente divulgación se refiere a la producción de proteínas parcialmente fucosiladas, que incluye anticuerpos parcialmente fucosilados, a partir de la célula.
- 55 La presente divulgación también se refiere al direccionamiento y a la alteración de genes aguas arriba y aguas abajo de las etapas bioquímicas clave que implican GDP-Fucosa.
- La presente divulgación emplea la tecnología CRISPR para producir proteínas no fucosiladas.
- 60 En la presente divulgación, una célula sin actividad de fucosilación también se denomina célula de "inactivación de fucosa" o célula "FKO".
- 65 El sistema CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular) es un mecanismo inmunitario de origen natural, adaptable, usado por muchas bacterias para protegerse a ellas mismas de ácidos nucleicos extraños, tales como virus o plásmidos. Las **CRISPR** son segmentos de ADN procariota que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases, seguido de segmentos cortos de "ADN espaciador". Este ADN espaciador es ADN extraño obtenido de exposiciones previas a virus o plásmido bacteriano. Un conjunto de enzimas denominadas enzimas **Cas** (del inglés **CRISPR-associated proteins**, proteínas asociadas a CRISPR) están en asociación con estas secuencias CRISPR, y las Cas son nucleasas que pueden cortar ADN.

La bacteria copia el material genético en cada ADN espaciador en una molécula de ARN. Las enzimas Cas luego toman una de las moléculas de ARN, que se denominan **ARN guía (ARNg)**. En conjunto forman el sistema CRISPR-Cas. Cuando el sistema encuentra ADN de un virus que se empareja con el ARN de CRISPR, el ARN hibrida con la secuencia de ADN y la enzima Cas entonces escinde el ADN en dos, evitando que el virus se replique.

5 Hay diversas enzimas Cas que funcionan en conjunto con CRISPR, pero lo mejor conocido y empleado con frecuencia en ingeniería genética es la nucleasa Cas9, que deriva de *Streptococcus pyogenes*. Conjuntamente, forman el sistema CRISPR/Cas9, llamado el sistema CRISPR de tipo II.

10 Se ha demostrado que Cas9 es un elemento clave en determinados mecanismos de CRISPR, específicamente, sistemas CRISPR de tipo II en donde solo se requiere una proteína Cas. En este sistema, la endonucleasa Cas9 participa en el procesamiento de los ARNcr que da como resultado la destrucción del ADN diana. La función Cas9 es dependiente de la presencia de dos dominios de nucleasa, un dominio de nucleasa de tipo RuvC localizado en el extremo amino terminal y un dominio de nucleasa de tipo HNH que reside en la región media de la proteína.

15 Para el reconocimiento y escisión de ADN específico de sitio, la nucleasa Cas9 debe complejarse con dos secuencias de ARN, un ARNcr (ARN de CRISPR) y un ARNtracr de transactivación separado (ARNtracr o ARNtr), que es parcialmente complementario al ARNcr. El ARNtracr se requiere para la maduración de ARNcr a partir de un transcrito primario que codifica múltiples pre-ARNcr. Esto tiene lugar en presencia de RNasa III y Cas9. Durante la escisión de ADN diana, los dominios de nucleasa de tipo HNH y RuvC de la nucleasa Cas9 cortan ambas cadenas de ADN, generando roturas de cadena doble (DSB). Los sitios de reconocimiento se definen por secuencia diana de 20 nucleótidos dentro de un transcrito de ARNcr asociado. El dominio HNH escinde la cadena complementaria, mientras que el dominio RuvC escinde la cadena no complementaria. La actividad de endonucleasa de cadena doble de Cas9 también requiere que una secuencia corta conservada, (2-5) conocida como motivo asociado al protoespaciador (PAM, del inglés *Protospacer-Associated Motif*), sigue inmediatamente en 3' de la secuencia complementaria de ARNcr en el ADN diana. El requisito de la secuencia PAM es obligatorio para la función de CRISPR/Cas.

30 En general, se usa un sistema de dos vectores para la modificación de genes mediada por CRISPR, 1) una endonucleasa Cas9 y 2) un complejo de ARNcr (ARN de CRISPR) y ARNtracr (ARNcr de transactivación). Cuando estas dos construcciones se coexpresan en células de mamífero, forman un complejo y se reclutan hacia la secuencia de ADN diana. El ARNcr y el ARNtracr se combinan para formar un ARN guía quimérico (ARNg) con la misma función - para guiar Cas9 hacia secuencias génicas diana.

35 Las tecnologías de modificación génica mediada por recombinación son las primeras de su tipo que se usan para la modificación de genes. Sin embargo, es muy rara la frecuencia de eventos exitosos usando HR, 1 de cada  $3 \times 10^4$  células.

40 En la actualidad, la nucleasa con dedos de zinc se está volviendo popular, ya que permiten una alta especificidad de direccionamiento con mayor frecuencia de eventos mutantes con éxito. Usa proteínas de unión a ADN con actividad nucleasa que se unen al ADN y crean DSB específicos de sitio. Aunque son eficaces, estos métodos requieren potentes herramientas de ingeniería de proteínas para ser exitosas y por lo tanto, limitan la flexibilidad en el direccionamiento de secuencias del genoma del complejo. La adaptación de CRISPR para las células de mamífero ha revolucionado la modificación genómica con una mayor precisión y facilidad del diseño. A diferencia de la ZFN, la CRISPR/Cas no requiere el diseño genético de proteínas para todos los genes que se direccionan.

50 El sistema CRISPR solo requiere unas pocas construcciones de ADN simple para codificar el ARNg y Cas9. Además, se direccionan múltiples genes de manera simultánea. En la divulgación, el sistema CRISPR/Cas se aplica para direccionar dos genes separados, FUT8 y GMD, en la vía de la biosíntesis de la fucosa. Aunque se produce información para el desarrollo de la línea celular CHOK de inactivación con el complejo individual CRISPR/Cas para los genes FUT8 y GMD, está claro que el complejo se podría usar junto con la inactivación de manera simultánea de ambos genes en líneas celulares CHOK y otras líneas celulares relevantes.

55 Aunque es raro para una secuencia de ARNg de 20 pb tener el 100 % de homología en múltiples sitios a lo largo del genoma, los complejos ARNg-Cas9 son tolerantes a varios desajustes en sus dianas. Se ha documentado que Cas9 se une a múltiples localizaciones en el genoma de forma no específica, sin embargo solo crea rotura de cadena doble de ADN en un puñado de esos sitios. Los datos experimentales también sugieren que determinados niveles de desajustes en el sitio diana de ADN permite la rotura de ADN de cadena doble. Por lo tanto, se siguen estrategias para aumentar la especificidad de CRISPR/Cas.

60 Una de estas observaciones es que una mutación puntual de Aspartato a Alanina (D10A) en el dominio catalítico RuvC dio como resultado roturas de cadena simple (incisiones) en lugar de roturas de cadena doble. La Cas9 mutante se conoce como Cas9n. El uso de Cas9n en dos sitios adyacente de diana de ADN permite la formación de incisiones de ADN en estrecha proximidad, y si los sitios diana están separados de manera apropiada, genera una rotura de cadena doble.

65

5 Por lo tanto, la especificidad de la creación de DSB es mayor, lo que eventualmente se repara mediante el mecanismo de NHEJ. La unión inespecífica de Cas9n solo genera incisiones que generalmente se reparan a través de la reparación mediada por HR y raramente genera mutación o efectos fuera de la diana. En la presente divulgación, se usan Cas9n y CRISPR para inactivar los genes Fut8 y GMD. En uno de los locus diana de GMD, también se usa la endonucleasa Cas9 de tipo silvestre.

En la presente divulgación, la construcción CRISPR-Cas tras la expresión en una célula proporciona el complejo CRISPR-Cas.

10 En la presente divulgación, las expresiones complejo CRISPR-Cas y sistema CRISPR-Cas se usan de manera intercambiable.

La presente divulgación se refiere a un método para la obtención de proteínas no fucosiladas, mediante la alteración o la inactivación de la maquinaria fucosilante en una célula.

15 La presente divulgación se refiere a un método para la obtención de proteínas parcialmente fucosiladas, mediante la alteración o la inactivación de la maquinaria fucosilante en una célula.

En una divulgación, la proteína es un anticuerpo.

20 En una divulgación preferida pero no limitante, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En la presente divulgación, las expresiones "anticuerpo no fucosilado", "anticuerpo afucosilado", "anticuerpo fucosilado al 0 %" y "anticuerpo no fucosilado al 100 %" se usan de manera intercambiable y tienen el mismo significado y alcance.

25 La presente divulgación se refiere en particular a la alteración o a la inactivación del gen FUT8 o del gen GMD en una célula. Cualquier experto en la materia entiende que ambos genes FUT8 y GMD se podrían alterar juntos en la misma línea celular para lograr una línea celular de inactivación de fucosa que usa las construcciones CRISPR/Cas descritas en la presente divulgación.

30 El gen FUT8 codifica la enzima  $\alpha$ -1,6 fucosiltransferasa. El gen GMD codifica la GDP-D-manosa 4,6-deshidratasa.

En una divulgación, la célula es una célula que de manera natural produce una proteína.

35 En una divulgación, la célula es una célula que de manera natural produce un anticuerpo.

En una divulgación, la célula es una célula que no produce de forma natural una proteína dada, y se introduce en la célula un gen que codifica la proteína.

40 En una divulgación, la célula es una célula que no produce de forma natural un anticuerpo, y se introduce en la célula un gen que codifica un anticuerpo.

En una divulgación, la célula es una célula que produce de forma natural un anticuerpo, y se introduce en la célula un gen que codifica un anticuerpo.

45 En una divulgación, la célula es una célula eucariota.

En una divulgación, la célula es una célula de mamífero.

50 En una divulgación, la célula es una célula de ovario de hámster chino.

En una divulgación, la célula es una célula de ovario de hámster chino K1 (CHOK1).

En una divulgación, la célula CHOK1 es una célula productora de anticuerpos.

55 En una divulgación, el anticuerpo producido por el método de la presente divulgación es un anticuerpo terapéutico.

En una divulgación, la célula CHOK1 no es una célula productora de anticuerpo, y en la célula se introduce un gen que codifica un anticuerpo.

60 En algunas divulgaciones, la línea celular se selecciona del grupo que consiste en COS, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO -DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV, VERO, MDCK, W138, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NSO, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T, YB23HL.P2.G11.16Ag.20, perC6, célula de hibridoma que produce anticuerpos, célula madre embrionaria, célula Namalwa, línea celular de insecto de *Spodoptera fugiperda* (Sf), Pichia, Saccharomyces y Schizosaccharomyces.

65

En una divulgación no limitante, la célula es una célula con inactivación de glutamina sintetasa (GS-/-), preferentemente una célula CHOK1 con inactivación de glutamina sintetasa (GS-/-).

5 En una divulgación, la célula se cita como una célula de "inactivación de fucosa" o una célula "FKO" o un soporte de "inactivación de fucosa" o un soporte "FKO".

En una divulgación, la célula se cita como una célula recombinante.

10 En una divulgación, el complejo CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular)-Cas se usa para alterar o inactivar la vía de fucosilación de una célula.

En una divulgación, el complejo CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular)-Cas se usa para alterar o inactivar uno o más genes de la vía de fucosilación de una célula.

15 En una divulgación, el complejo CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular)-Cas se usa para alterar o inactivar o mutar el gen seleccionado del grupo que comprende  $\alpha$  1,6 Fucosil transferasa (gen Fut8), GDP manosa 4, 6 deshidratasa (gen GMD), GDP-ceto-6 desoximanosa 3,5 epimerasa 4-reductasa (gen FX), GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa (gen GEPP), y gen de Fucosa cinasa.

20 En una divulgación, la presente divulgación se refiere a la alteración de una combinación de gen Fut8 y gen GMD en una célula mediante el complejo CRISPR/Cas de la presente divulgación.

25 En la vía de fucosilación *de novo*, se sintetiza GDP-fucosa a través de la conversión de GDP-manosa a GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa, catalizado por la enzima GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD). Esta GDP-fucosa se transporta después a dentro del golgi y se usa como un sustrato para la fucosilación de proteína por la enzima  $\alpha$ -(1-6) fucosiltransferasa. La enzima transfiere el resto de fucosa de la GDP-fucosa a la N-acetil glucosamina de la cadena de N-glicano.

30 En una divulgación, el complejo CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular)-Cas se usa para alterar el gen Fut8 que codifica la enzima  $\alpha$ -1,6 fucosiltransferasa.

35 En una divulgación, el complejo CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular)-Cas se usa para alterar el gen GMD que codifica la enzima GDP-manosa 4, 6-deshidratasa. En una divulgación, la región catalítica N-terminal de la enzima fucosil transferasa se direcciona mediante el complejo CRISPR/Cas.

En una divulgación, el sitio activo de la enzima GDP-manosa 4, 6-deshidratasa se direcciona mediante el complejo CRISPR/Cas.

40 En una divulgación particular, el exón 7 de la secuencia génica de Fut8 se direcciona mediante el complejo el complejo CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular)-Cas.

45 En una divulgación, la enzima fucosiltransferasa se muta a una posición de aminoácido seleccionada de las secuencias de aminoácidos en la hebra beta 2 y la región de la hélice 3H2 codificada por la secuencia codificante del exón 7. Los clones resultantes pueden dar como resultado la parada prematura de la traducción, y por lo tanto, la ausencia de secuencias aguas abajo tales como Arg-365, Arg-366, Asp-368, Lys-369, Glu-373, Tyr-382, Asp-409, Asp-410, Asp-453, Ser-469 y combinaciones de los mismos.

50 En una divulgación particular, el exón 3 o el exón 4 de la secuencia génica de GMD se direcciona mediante construcciones CRISPR /Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas de forma regular).

55 Las construcciones CRISPR/Cas están diseñadas como un sistema de dos vectores, en general. Una construcción codifica la expresión de endonucleasa Cas9 y el segundo vector expresa el ARNg - que está hecho de ARNcr y ARNtracr. El ARNcr normalmente está diseñado como un fragmento de 20 nucleótidos de longitud que reconoce la secuencia diana en función del posicionamiento correcto del ARNtracr, la secuencia PAM y el complejo funcional de ARNcr-Cas9-ARNtracr. En determinados casos, un único vector expresa tanto ARNg y la proteína Cas9 para una mayor actividad y facilidad de uso. La especificidad del reconocimiento de la diana proviene del diseño de ARNcr.

60 En algunas divulgaciones, el dominio de unión a ADN también se cita como el dominio de reconocimiento de ADN.

En una divulgación, también se proporcionan los polinucleótidos que codifican dicho complejo CRISPR/Cas, ya que son células que comprenden dichos polinucleótidos.

65 En una divulgación, se proporcionan los nucleótidos que codifican el dominio de unión a ADN del complejo CRISPR/Cas9. En otra divulgación, se proporcionan los nucleótidos que codifican el dominio de nucleasa del complejo CRISPR/Cas9.

En una divulgación, la nucleasa es Cas9.

En otra divulgación, la nucleasa es el mutante D10A de Cas9n (nickasa, de *nick*, incisión).

5 En una divulgación, el complejo CRISPR/Cas reconoce el sitio diana en el gen FUT8 o el gen GMD. En una divulgación, la nucleasa es una endonucleasa de asentamiento. En otra divulgación, la nucleasa es una meganucleasa. También se sabe que la especificidad de las endonucleasas de asentamiento y de las meganucleasas se pueden diseñar para la unión a sitios diana no naturales. Además, en divulgaciones a modo de ejemplo, las endonucleasas de asentamiento incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIY, I-CsmI, I-PanI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellI, I-CreI, I-TevI, I-TevII y I-TevIII. Se conocen sus secuencias de reconocimiento.

10 En una divulgación, se usa una combinación de una o más de las nucleasas mencionadas anteriormente con el dominio de unión a ADN del complejo de proteína CRISPR-Cas.

15 En una divulgación, se usa la transfección para introducir un complejo CRISPR/Cas en una célula. Aunque se proporciona un protocolo de lipofección como una divulgación a modo de ejemplo, cualquier método de transfección conocido para un experto en la materia es igualmente aplicable a los métodos de la presente divulgación.

20 En otra divulgación, la presente divulgación proporciona metodologías para producir proteínas recombinantes en cualquier célula hospedadora en donde la célula hospedadora tiene expresión de gen FUT8 o GMD endógeno que se direcciona a través de la tecnología de CRISPR/Cas para alterar el gen FUT8 o GMD endógeno tal como se describe en el presente documento. La línea celular resultante es nula para la expresión del gen FUT8 o del gen GMD y se usa adicionalmente para la expresión del gen de interés.

25 En la presente divulgación, se crean diecisiete líneas celulares clonales de inactivación de FUT8 a partir de un cribado de menos de 60 líneas celulares clonales generadas tras la transfección con el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553). En comparación, solo tres líneas celulares FUT8/- se podrían seleccionar a partir de aproximadamente 120.000 líneas celulares clonales tal como se documenta en la técnica anterior.

30 En la presente divulgación, se crean treinta líneas celulares clonales de inactivación de GMD a partir de un cribado de menos de 200 líneas celulares clonales generadas tras la transfección con el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404).

35 La especificidad, seguridad y simplicidad del protocolo son algunas de las ventajas ofrecidas por el complejo CRISPR/Cas y el método de la presente divulgación sobre los métodos de la técnica anterior. La alteración génica mediada por CRISPR proporciona una ventaja única de especificidad del locus diana que permite que el complejo CRISPR/Cas hecho a medida reconozca la secuencia diana de cualquier complejidad definida por el usuario. El complejo CRISPR/Cas es más eficaz que la ZFB en términos de eficacia de modificación del genoma y es significativamente menos tóxico, lo que permite por lo tanto una mayor eficacia en la generación de clones mutantes frente a un locus particular. En la presente divulgación, los loci genómicos de FUT8 y los loci genómicos de GMD se direccionan para la modificación específica de la secuencia a través de los ARNg de CRISPR.

40 La metodología descrita en el presente documento ha logrado una tasa de eficacia de más del 28 % de éxito de generación de líneas celulares de inactivación de FUT8 en CHOK1 (17 líneas celulares de inactivación en CHOK1 de un cribado de menos de 60 poblaciones celulares clonales) y una tasa de éxito del 15 % de generación de líneas celulares de inactivación de GMD en CHOK1 (30 líneas celulares de inactivación de GMD en CHOK1 de 200 poblaciones de células clonales). Este logro imprevisto siguiendo la metodología y las construcciones específicas de CRISPR de la presente divulgación ha mejorado enormemente el desarrollo de líneas celulares de inactivación de FUT8 y GMD.

45 Además, la presente divulgación ha usado solamente un conjunto de construcciones de CRISPR que se direccionan a una localización genómica muy específica en la secuencia de ADN de FUT8 en CHOK1 y dos sitios separados en los loci genómicos de GMD en CHOK1. Sorprendentemente, el complejo CRISPR/Cas da como resultado no solo la alteración de los aminoácidos direccionados sino que también produce deleciones largas que introducen mutaciones de desplazamiento del marco y codón de parada prematura. De este modo, la presente divulgación ha logrado muchas líneas celulares de inactivación de FUT8 en CHOK1 y múltiples líneas celulares de inactivación GMD con modificaciones muy pequeñas del ADN en el locus diana así como grandes modificaciones a nivel genómico en los loci de FUT8 y GMD direccionados. La generación de tal número grande de líneas celulares de inactivación de FUT8 y GMD en CHOK1 es inesperada, considerando el pequeño número de poblaciones clonales cribadas para el fenotipo de inactivación de fucosa. Este logro sorprendente proporciona la selección de múltiples líneas celulares de inactivación de FUT8 en CHOK1 y líneas celulares de inactivación de GMD para establecer las líneas celulares de mejor rendimiento para la sobreexpresión de anticuerpo monoclonal.

60 En una divulgación, el gen de interés se introduce en la línea celular resultante a través de un vector de expresión que comprende secuencias de ADN que codifican la proteína de interés, produciendo de este modo la proteína

recombinante.

En otra divulgación, la proteína expresada de interés incluye anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales.

- 5 En algunas divulgaciones, la inactivación de un gen FUT8 da como resultado una línea celular que produce proteínas recombinantes a mayores niveles.

En algunas divulgaciones, la inactivación de un gen GMD da como resultado una línea celular que produce proteínas recombinantes a mayores niveles.

- 10 En determinadas divulgaciones, la inactivación de un gen FUT8 proporciona una línea celular en la que aumenta una o más actividades (funciones) de una proteína, en comparación con proteínas producidas en células en donde el gen FUT8 no está inactivado.

- 15 En determinadas divulgaciones, la inactivación de un gen GMD proporciona una línea celular en la que aumenta una o más actividades (funciones) de una proteína, en comparación con proteínas producidas en células en donde el gen GMD no está inactivado.

En una divulgación, la proteína no fucosilada producida por la célula es un anticuerpo no fucosilado.

- 20 En una divulgación no limitante, la proteína no fucosilada es un anticuerpo IgG1 no fucosilado, y preferentemente un anticuerpo IgG1 monoclonal no fucosilado.

- 25 En una divulgación, el anticuerpo no fucosilado presenta una mayor función efectora que un anticuerpo fucosilado correspondiente.

En una divulgación, el anticuerpo no fucosilado presenta propiedades terapéuticas más eficaces que un anticuerpo fucosilado correspondiente.

- 30 En una divulgación, el anticuerpo no fucosilado presenta una mejor toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que un anticuerpo fucosilado correspondiente.

En la presente divulgación, los métodos, la preparación y el uso de las proteínas desveladas emplean, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, química computacional, cultivo celular, tecnología del ADN recombinante, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas relacionadas. Estas técnicas, sus principios y sus requisitos se explican en la bibliografía y son conocidas para un experto en la materia. Las técnicas para determinar la identidad de secuencia del ácido nucleico y de los aminoácidos son conocidas para un experto en la materia.

- 40 La célula con la maquinaria de fucosilación alterada es una célula que produce anticuerpos de forma natural, o una célula en la que se introduce un gen que codifica un anticuerpo antes o después de la alteración de la fucosilación.

- 45 Un "fragmento funcional" de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa, todavía mantiene la misma función que la proteína, polipéptido o ácido nucleico de longitud completa.

- 50 El término "anticuerpo" usado en el presente documento incluye tanto preparaciones de anticuerpo policlonal como monoclonal y también incluye lo siguiente: moléculas de anticuerpos quiméricos, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y F(ab), moléculas de Fv, moléculas Fv de cadena simple (scFv), fragmentos de anticuerpos diméricos y triméricos, minicuerpos, moléculas de anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden la región Fc del anticuerpo y cualquiera de los fragmentos funcionales que surgen de estas moléculas, en donde las moléculas derivadas mantienen la funcionalidad inmunológica de la molécula de anticuerpo parental.

- 55 La expresión "anticuerpo monoclonal" en la presente divulgación, se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpo homogénea. El anticuerpo no se limita a la especie o fuente del anticuerpo o por la manera en que se produce. El término abarca inmunoglobulinas completas, así como fragmentos tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y otros fragmentos, así como poblaciones homogéneas de anticuerpos quiméricos y humanizados que presentan propiedades de unión inmunológica de la molécula de anticuerpo monoclonal parental.

- 60 Cabe destacar que los clones/células de la presente divulgación se citan con términos tales como CR1KOT1#06, CR1KOT1#23 etc., que son denominaciones internas y no representan ninguna característica particular de la célula. Estas líneas celulares se desarrollan usando el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 514-553).

- 65 Cabe destacar que los clones/células de la presente divulgación se citan con términos tales como C1GMD1.12, C1GMD1.27, etc., que son denominaciones internas y no representan ninguna característica particular de la célula. Estas líneas celulares se desarrollan usando el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207).

Cabe destacar que los clones/células de la presente divulgación se citan con términos tales como CIGMD2.30, CIGMD2.34, etc., que son denominaciones internas y no representan ninguna característica particular de la célula. Estas líneas celulares se desarrollan usando el complejo CRISPR/Cas pD1301 (ARNg 404).

5 Cabe destacar que los clones/células de la presente divulgación se citan con términos tales como CIGMD3.36, CIGMD3.43, etc., que son denominaciones internas y no representan ninguna característica particular de la célula. Estas líneas celulares se desarrollan usando una combinación del complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404).

10 En una divulgación, se proporciona una composición que comprende el anticuerpo no fucosilado, opcionalmente junto con un vehículo o aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El vehículo o aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable se determina mediante la composición que se está administrando, así como mediante el método particular usado para administrar la composición y es conocido por un experto en la materia.

15 Todas las secuencias proporcionadas por la presente divulgación se leen en la dirección 5' a 3', a menos que se indique lo contrario.

20 Los excipientes son importantes para lograr la estabilización de la proteína y mejorar otras cualidades de las biología. Se añade varios excipientes a composiciones para estabilizar proteínas, actuar como agentes antimicrobianos, ayudar en la fabricación de la forma de dosificación, controlar o dirigir la administración del fármaco, y minimizar el dolor tras la inyección.

25 Los excipientes se pueden dividir ampliamente en cinco categorías basándose en sus modos de acción:

1. Estabilizantes de proteínas: Estos excipientes estabilizan la conformación natural de la proteína. Los ejemplos incluyen polioles, azúcares, aminoácidos, aminos y sales de precipitación. La sacarosa y trehalosa son los azúcares usados con más frecuencia y los polioles largos son mejores estabilizantes que los polioles más pequeños.

30 2. Polímeros y proteínas: Los polímeros hidrófilos, tales como polietilenglicoles (PEG), polisacáridos y proteínas inertes, se usan de manera inespecífica para estabilizar proteínas y mejorar el ensamblaje de las proteínas. Los ejemplos incluyen dextrano, almidón hidroxietílico (HETA), PEG-4000 y gelatina.

35 3. Tensioactivos: Los tensioactivos no iónicos se usan ampliamente para estabilizar proteínas, suprimir la agregación y ayudar en el repliegamiento proteico. Polisorbato 80 y polisorbato 20, también conocidos como Tween 80 y Tween 20, respectivamente, se usan generalmente en agentes terapéuticos de mA. otros ejemplos incluyen Brij 35, Triton X-10, Pluronic F127, dodecilsulfato de sodio (SDS).

4. Aminoácidos: Estos excipientes estabilizan las proteínas mediante varios mecanismos. Los ejemplos incluyen histidina, arginina y glicina. Otros aminoácidos usados como excipientes de formulación incluyen mezclas de metionina, prolina, lisina, ácido glutámico y arginina.

40 5. Conservantes: Estos compuestos se incluyen en formulaciones para evitar el crecimiento microbiano. Los ejemplos incluyen alcohol bencílico, m-Cresol y fenol.

El material biológico usado en la presente divulgación se obtiene de fuera de la India.

#### 45 **Fundamentos para el direccionamiento de secuencia genómica específica en el locus de FUT 8**

FUT8 está comprendido de tres dominios, un dominio de superhélice en N-terminal, un dominio catalítico y un dominio SH3 en C-terminal.

50 La estructura de la proteína Fut8 se estudia a fondo para entender el dominio funcional de la secuencia de aminoácidos de la enzima. La estructura cristalina tridimensional de la enzima FUT8 reveló 15 hebras y 16 hélices. Hay al menos tres regiones, el extremo N-terminal (restos 68-107), el extremo C-terminal (573-575) y los restos 368-372 que están desordenados.

55 El presunto dominio catalítico de la enzima FUT8 consiste en dos dominios, un dominio alfa/beta de lámina abierta y el pliegue de Rossmann ampliamente conocido por la región de unión a nucleótidos. El dominio alfa/beta consistió en cinco hélices y tres cadenas beta, que son alfa 4, 3H1, 3H2, 3H3, y las cadenas beta 1, beta 2 y beta 3. El dominio se localiza en el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína. No hay evidencias claras de cómo el dominio catalítico del extremo N-terminal es responsable de la funcionalidad de la enzima.

60 El pliegue de Rossmann se localiza aguas abajo, en los restos 359-492 y contiene varias hélices alfa y cadenas beta. Una serie de restos, Arg 365, Arg366, Asp-368, Lys-369, Glu-373, Tyr-382, Asp-409, Asp-410, Asp-453 y Ser-469 desempeña un papel importante en el dominio catalítico de la enzima FUT8.

65 Diez restos de aminoácidos, Arg365, Arg366, Asp-368, Lys-369, Glu-373, Tyr-382, Asp-409, Asp-410, Asp-453 y Ser-469 de la proteína enzimática FUT8 humana se conservan entre diversas especies, que incluyen los

vertebrados, insectos, nemátodos y ascidias tal como se observa en la figura 19 de la presente divulgación.

Para entender la contribución de la secuencia de aminoácidos específica en el gen FUT8 en la actividad  $\alpha$  1,6 fucosiltransferasa, las regiones de la secuencia de aminoácidos de FUT8 se comparan entre múltiples especies. El alineamiento muestra que las secuencias de la enzima constituyen restos de aminoácidos altamente conservados en la cadena beta 2 y en la región de hélice 3H2. Por tanto, estas posiciones de aminoácidos son la diana del complejo CRISPR/Cas en el método de la presente divulgación.

### **Fundamentos para el direccionamiento de los genes GMD y FUT8 en la línea celular CHOK1**

El soporte de inactivación de fucosa es útil para lograr el desarrollo de la molécula de anticuerpo monoclonal no fucosilado. En muchos casos, el desarrollo de un anticuerpo completamente no fucosilado es un resultado preferido y, por lo tanto, se preparan estrategias en la presente divulgación para crear inactivaciones completas de los genes de la vía de la biosíntesis de la fucosa. En determinados casos, el producto de fármaco terapéutico de anticuerpo monoclonal puede requerir la fucosilación parcial, que no está disponible de forma natural. Para crear versiones diseñadas de anticuerpos monoclonales fucosilados para fines terapéuticos, la línea celular CHOK1 de inactivación de GMD es muy útil.

El gen GMD está implicado en la vía de fucosilación, aguas arriba del gen FUT8 y es responsable de la síntesis de GDP-fucosa a través de la conversión de GDP-manosa a GDP-4-ceto-6-desoxi-manosa. Esta etapa es una de las etapas críticas de la vía de biosíntesis de fucosa *de novo*. La GDP fucosa también se produce en células a través de la vía de rescate y se usa para la fucosilación de proteínas celulares. En la vía de rescate, las células captan fucosa del medio de crecimiento. La vía *de novo* para la biosíntesis de fucosa se detiene por completo si el gen GMD está inactivo y completamente no funcional. La biosíntesis de GDP-fucosa aún permanece activa a través de la vía de rescate si el medio de crecimiento se suplementa con fucosa. Por lo tanto, la vía de biosíntesis de fucosa y la fucosilación de proteína celular aún permanece activa.

Las líneas celulares CHOK1 de inactivación de GMD proporcionan una ventaja única si el anticuerpo monoclonal necesita estar defucosilado al 100 %, se utiliza el soporte celular de inactivación doble de GMD. En casos, en donde los anticuerpos monoclonales requieren un nivel específico de fucosilación, se utiliza la vía de rescate para generar GDP-Fucosa a través de la suplementación del medio de crecimiento con L-fucosa. Esencialmente, el nivel de fucosilación de anticuerpo monoclonal se logra a través de niveles de titulación de L-fucosa en medio de crecimiento. Por lo tanto, la estrategia de inactivación de GMD proporciona un producto no fucosilado al 100 % a niveles variables de fucosilación mediante titulación simple de L-fucosa en medio de cultivo de CHOK1. Esta es una estrategia única para controlar la fucosilación de la producción de anticuerpo monoclonal en células CHOK1.

Por otro lado, la enzima Fut8 funciona aguas abajo de la etapa de biosíntesis de GDP-fucosa y es la última etapa enzimática para la fucosilación de proteínas celulares en el golgi. Los precursores de fucosilación de la vía *de novo* y de rescate usan la enzima FUT8 para la transferencia del resto a la fucosa final. Por lo tanto, la inactivación del gen Fut8 esencialmente detiene tanto la vía *de novo* como la de rescate de la fucosilación de proteína celular. Esta estrategia da como resultado una defucosilación del 100 % de anticuerpos monoclonales producidos en la línea celular CHOK1 de inactivación de Fut8.

### **Direccionamiento del sitio activo de GMD:**

La enzima GDP-D-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) cataliza la conversión de GDP-D-manosa al intermediario GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa. Esto funciona como un punto de ramificación para diferentes desoxihexosas, incluyendo GDP-D-ramnosa, GDP-L-fucosa, GDP-6-desoxi-D-talosa, y GDPdesoxi aminoazúcar GDP-D-perosamina. Entre estos, la GDP-L-fucosa es un intermediario importante en la vía de la biosíntesis de la fucosa. GMD es un miembro de la subfamilia modificadora de NDP-azúcar de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR).

Como miembro de esta subfamilia, GMD se une a su cofactor NADP(H) en la porción de N-terminal de la molécula en la que está presente una región común rica en glicina. La tríada catalítica se ha identificado como Tyr-XXX-Lys y Ser/Thr, que son todas importantes para la catálisis. Aunque hay una variabilidad significativa en la secuencia de aminoácidos en miembros de este grupo de enzimas, existen similitudes en la estructura tridimensional.

El análisis estructural de GMD de *E. coli* sugiere que la molécula activa está en configuración dimérica. Mientras que el homólogo de *Arabidopsis thaliana* es tetramérico, y el sitio de unión de NADP(H) está íntimamente implicado en la creación de la superficie de contacto del tetrámero. Lo más probable es que la forma funcional de la enzima GMD en eucariotas consista en la configuración tetramérica. La GMD cristaliza con cuatro unidades monoméricas y los monómeros interaccionan entre sí para formar el dominio catalítico. Los monómeros opuestos interaccionan a través de enlaces de hidrógeno entre Asn 163, Arg147, Glu166, Tyr145 y Arg47. La tetramerización de GMD da como resultado sitios de unión de cofactor adecuados (NADPH) en la zona de contacto. Ser85 desempeña un papel crucial en los enlaces de hidrógeno con pirofosfato en el sitio activo. Además, los hidroxilos de nicotinamida ribosa están dentro de la distancia del enlace de hidrógeno con los restos catalíticos Tyr150 y Lys154, interacciones que están altamente conservadas en enzimas SDR.

El bucle RR, un segmento de nueve restos (Ag35-Arg43), se estira en el monómero adyacente haciendo interacciones proteína-proteína y contactos con el cofactor adyacente. Las interacciones proteína-proteína incluyen enlaces de hidrógeno de Arg35 con Ser85 y Glu188. Para la unión al sustrato, se ha documentado que la interacción

5 de GDP-D-manosa podría depender de la capacidad para hacer posibles enlaces de hidrógeno con Thr126, Ser127 y Glu128. Además, los restos catalíticos Thr126 y Tyr150 así como Ser85 podrían hacer enlaces de hidrógeno con el hidroxilo 04 de la hexosa. El mecanismo catalítico propuesto para GMD implica unos pocos restos clave como Thr126, Ser127, Glu128, Tyr150 entre otros.

10 Considerando la importancia de estos restos, se han direccionado múltiples complejos CRISPR/Cas que potencialmente alteran la configuración tetramérica de la enzima activa así como afectan a la región de unión al cofactor y a los motivos de interacción con el sustrato. Se diseña una construcción de CRISPR en la zona de contacto dimérica propuesta en la secuencia de aminoácidos ADVDGVGTLRLL. Esta región es parte del Exón 4 del gen GMD. La construcción CRISPR se direcciona a la endonucleasa Cas9 para crear una rotura de ADN de cadena

15 doble en el exón 4. El sitio de la rotura se localiza antes de los restos clave de aminoácidos en el motivo ADVDGVGTLRLL con el supuesto de que cualquier modificación en estos aminoácido afecta directamente al mecanismo catalítico de la enzima GMD.

Un segundo conjunto de complejos CRISPR/Cas se diseña en el exón 3 del gen GMD. Este diseño de CRISPR es único para alta especificidad, cuando un mutante de Cas9, conocido como mutante de nickasa D10A Cas9 (Cas9n) se elige, provocando una rotura de ADN de cadena simple. Los dos complejos CRISPR/Cas diseñados para dos roturas de ADN de cadena simple permiten un alto nivel de especificidad. Las construcciones se diseñan en un motivo de secuencia de aminoácidos de zona de contacto tetramérica propuesto YGDLTDSTCLVK. Las dos roturas de cadena simple permiten la reparación del ADN por el mecanismo NHEJ e introducen mutaciones en esta región. Estas mutaciones afectan al resto importante Ser85 implicado en el mantenimiento de interacciones de los monómeros en la configuración tetramérica.

20 La posición de motivos estructurales importantes en el exón 3 y en el exón 4 del gen MD y en posiciones diana de CRISPR se ilustran en la figura 9B.

30 Ambos diseños de CRISPR/Cas son únicos y logran un alto potencial en la generación de líneas celulares CHOK1 de inactivación de fucosa.

#### **Direccionamiento del sitio activo de Fut8:**

35 Uno de los aspectos más importantes de la presente divulgación es el direccionamiento del sitio catalítico de la enzima  $\alpha$  1,6-fucosiltransferasa, codificado por el gen Fut8. La estructura de la proteína Fut8 se estudia a fondo para entender el dominio funcional de la secuencia de aminoácidos de la enzima. La estructura cristalina tridimensional de la enzima FUT8 reveló 15 hebras y 16 hélices. Hay al menos tres regiones, el extremo N-terminal (restos 68-107), el extremo C-terminal (573-575) y los restos 368-372 que están desordenados.

40 El presunto dominio catalítico de la enzima FUT8 consiste en dos dominios, un dominio alfa/beta de lámina abierta y el pliegue de Rossmann ampliamente conocido por la región de unión a nucleótidos. El dominio alfa/beta consiste en cinco hélices y tres cadenas beta, que son alfa 4, 3H1, 3H2, 3H3, y las cadenas beta 1, beta 2 y beta 3. El dominio se localiza en el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína. No hay evidencias claras de cómo el dominio catalítico del extremo N-terminal es responsable de la funcionalidad de la enzima. Las secuencias diana CRISPR/Cas se direccionan en esta región. El locus genómico del exón 7 de Fut 8, la respectiva secuencia de aminoácidos y la posición de los motivos estructurales importantes y las posiciones diana de CRISPR se ilustran en la figura 9A.

50 Este direccionamiento no es una selección aleatoria, pero se ha llegado a ella, en la presente divulgación, mediante experimentación para determinar la posición altamente específica en el gen o enzima, cuya alteración asegura que la fucosilación parcial que está causada por la enzima truncada o parcialmente funcional se evita.

55 El plegamiento Rossmann, por otro lado, se localiza aguas abajo en el resto 359-492 y contiene varias hélices alfa y cadenas beta. Una serie de restos, Arg 365, Arg366, Asp-368, Lys-369, Glu-373, Tyr-382, Asp-409, Asp-410, Asp-453 y Ser-469 desempeña un papel importante en el dominio catalítico de la enzima FUT8.

60 Por tanto, el direccionamiento de la región equivalente al sitio activo de la enzima asegura la alteración completa del gen Fut8 y proporciona resultados eficaces en comparación cualquier técnica que es incapaz de direccionar una posición concreta en el gen Fut8 o una técnica que direcciona otra localización en el gen Fut8, que podría dar como resultado una alteración parcial del gen Fut8 y de la actividad de la enzima. Una célula con una maquinaria fucosilada parcialmente funcional produce proteínas parcialmente fucosiladas, que muestran menores funciones terapéuticas en comparación con las proteínas no fucosiladas. Las células producidas por el método de la presente divulgación produce proteínas completamente o al 100 % no fucosiladas, incluyendo anticuerpos no fucosilados al

65 100 %.

La presente divulgación introduce mutaciones en posiciones críticas de aminoácidos en el sitio catalítico de la secuencia de codón de FUT8 a través del complejo CRISPR/Cas. El diseño de CRISPR se centra principalmente en el direccionamiento del dominio catalítico de N-terminal, específicamente la cadena beta 2 y la región de la hélice 3H2 mediante la incorporación de roturas de cadena simple. El sistema de reparación de ADN celular introduce cambios de nucleótidos mientras lleva a cabo la reparación de la cadena simple y crea una enzima FUT8 no funcional.

El sistema CRISPR es bien conocido por la delección e inserción de manera localizada y por lo tanto crea una mutación de desplazamiento del marco en el exón 7 direccionado e inserta codones de parada. La introducción de codones de parada asegura la finalización prematura de la traducción y el plegamiento Rossmann de aguas abajo se excluye de la estructura de la enzima, dando como resultado una enzima FUT8 no funcional.

En una divulgación, el posterior análisis de ADN genómico de las líneas celulares de CHOK1 modificadas revela la delección, inserción, el codón de parada así como mutaciones de desplazamiento del marco. Por tanto, la presente divulgación contempla la alteración del gen Fut8 y la enzima fucosiltransferasa mediante el direccionamiento de posiciones de aminoácidos en la cadena beta 2 y en la hélice 3H2 a través de delecciones, inserciones y/o mutaciones de desplazamiento del marco.

Los clones resultantes pueden dar como resultado la parada prematura de la traducción, provocando de este modo grandes cambios en secuencias críticas aguas abajo, tales como Arg-365, Arg-366, Asp-368, Lys-369, Glu-373, Tyr-382, Asp-409, Asp-410, Asp-453, Ser-469 y combinaciones de los mismos.

La Figura 19 de la presente divulgación ilustra la alineación de la secuencia de aminoácidos de FUT8 de rata, ser humano, ratón, vaca y hámster chino. Los aminoácidos en el plegamiento de Rossmann 365, 366, 368, 369 y 373 están marcados con asteriscos. Los aminoácidos en el recuadro sombreado indican restos no alineados con la secuencia consenso. Los aminoácidos en la región del exón 7 también están marcados. Las secuencias de reconocimiento de CRISPR están marcadas por líneas gruesas.

En la presente divulgación, se analiza la secuencia de aminoácidos de FUT8 de la base de datos genómica de CHOK1 y se confirma que estos aminoácidos críticos se conservan en el gen FUT8 derivado de la línea celular de CHOK1. Se diseñó el complejo CRISPR/Cas específico de secuencia, se direccionando las secuencias génicas aguas arriba de estos motivos de aminoácidos para introducir modificaciones genómicas. Se analizó cómo la alteración de las secuencias de aminoácidos aguas arriba del dominio catalítico crítico de la enzima FUT8 altera la función enzimática.

Se indica que la mutación de estos aminoácidos críticos proporciona la alteración completa de la funcionalidad del gen FUT8. El direccionamiento génico usando la tecnología CRISPR/Cas es una nueva estrategia para crear un soporte de línea celular de inactivación de fucosa. Las células transfectadas por CRISPR/Cas se criban a través de ensayos de funcionalidad del gen FUT8. Los clones seleccionados se confirman a través de la secuenciación de los loci de FUT8 genómicos para mutaciones. La línea celular mutante CHOK1 de inactivación de fucosa se usa entonces para la expresión de proteínas terapéuticas no fucosiladas, incluyendo anticuerpos monoclonales terapéuticos no fucosilados o parte de los anticuerpos.

Se diseñan construcciones CRISPR/Cas que se dirigen específicamente a las secuencias de codones de aminoácidos en localizaciones genómicas y se clonan en vectores de expresión, por ejemplo, pD1401 o pD1301, en función del tipo de gen Cas9. El complejo CRISPR/Cas se transfecta de manera transitoria en células CHOK1; las células se colocan en placas de 96 pocillos para la generación de colonias individuales. Cada clon se criba después para la fucosilación de proteínas celulares usando el ensayo de aglutinina de *Lens culinaris* (LCA, del inglés *Lens culinaris agglutinin*). Los clones positivos para la alteración del gen FUT8 o GMD se ensayan adicionalmente a través de ensayos enzimáticos y el análisis cinético de los alelos mutantes del gen FUT8 o del gen GMD. Por último, se analiza cualquier mutación llevada a cabo a través de CRISPR/Cas en la secuencia genómica en los loci de FUT8 y GMD. Estas mutaciones implican delecciones o inserciones, que introducen de este modo mutaciones de desplazamiento de marco de la secuencia de codón de FUT8 y GMD, y produciendo la secuencia alterada y las enzimas no funcionales.

La línea celular CHOK1 de inactivación de fucosa derivada del proceso mencionado anteriormente se usa como un soporte de línea celular para la expresión de proteínas, anticuerpos monoclonales, péptidos, proteínas de fusión de fines terapéuticos, desarrollo de biomarcadores, usos de diagnóstico y de pronóstico.

La presente divulgación se describe adicionalmente con referencia a los siguiente ejemplos, que son solo de naturaleza ilustrativa y de no deberían interpretarse en ningún caso como limitantes del alcance de la presente divulgación.

#### **Preparación del reactivo**

**Medio de crecimiento completo DMEM avanzado - 500 ml**

1. Se añaden 50 ml de FBS (10 % de concentración final) a la cámara superior de la unidad de filtro de 500 ml.
2. Se añaden 10 ml de glutamina 200 mM (4 mM de concentración final).
3. Se añaden 5 ml de solución Pen-strep a 100X (1X de concentración final).
4. Se ajusta el volumen a 500 ml con medio DMEM avanzado.
5. El medio completo se filtra a través de un filtro de 0,22 µm.
6. La cámara superior se desmonta y se cierra el reservorio o recipiente del medio.
7. El medio se puede usar en 30 días de preparación.
8. El medio se almacena a 2 °C a 8 °C y lejos de la exposición continua a la luz.
9. En los casos en los que se prepara el medio de selección de LCA, se mezclan 10 ml de 10 mg/ml de reactivo LCA del reservorio con 500 ml de medio DMEM preparado para lograr una concentración final de LCA de 200 µg/ml en medio DMEM.

**Materiales y equipo**

1. Cabina de bioseguridad
2. Centrífuga Sorvall ST 16R
3. Sistema de baño de agua
4. Microscopio de contraste de fase inversa
5. Incubador de CO2
6. Citómetro de flujo de mesa de trabajo Millipore GUAVA 8HT easyCyte
7. Analizador de viabilidad celular Vi-cell XR
8. Hemocitómetro
9. Refrigerador
10. Centrifugadora de Eppendorf Minispin
11. Micropipetas
12. Micropuntas
13. Placas de cultivo tisular de 96 pocillos
14. placas de cultivo tisular de 12 pocillos
15. Placas de cultivo tisular de 6 pocillos
16. Pipetas serológicas (de 10 ml, 25 ml y 50 ml)
17. Unidad de filtración de 1000 ml (tamaño de poro de 0,22 µm)
18. Etanol al 70 %
19. DMEM avanzado
20. Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DMEM)
21. Suero fetal bovino (FBS)
22. Penicilina-Estreptomicina (Pen-strep)
23. Glutamina
24. Tripsina-EDTA al 0,05 %
25. Azul de tripano al 0,4 %
26. Tubos de microfuga (de 1,5 ml y 2 ml)
27. Tubos Falcon (de 15 ml y 50 ml)
28. Fracción V de albúmina de suero bovino
29. Aglutinina de Lens culinaris-Fluoresceína (LCA-FITC)
30. Estreptavidina-Fluoresceína (Strep-FITC)

**Tabla 1: Reactivos usados en la presente divulgación**

S.N.º	Reactivo	Composición
1	Agarosa	Agarosa (SIGMA, Cat-A9539)
2	Marcador de ADN de 1 kb	Marcador de 1 kb (Thermoscientific Cat-SM0311)
3	Marcador de ADN de 100 pb	Marcador de 100 pb (Thermoscientific, Cat-SM0322)
4	kit de aislamiento de ADN genómico QIAGEN	DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Cat-69504)
5	ADN polimerasa Taq	ADN polimerasa Taq con termopol (NEB, Cat-M0267 y M0273L)
6	ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad	ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad (Thermo Scientific, Cat-F530L)
7	PCR de clonación InsTAclone	Vector de clonación TA pTZ57R/T (Thermo Scientific, Cat-K1214)
8	Células competentes DH10B	Células competentes DH10B de máxima eficacia (Invitrogen, Cat-18297-010)
9	Células competentes DH5alpha	Células competentes NEB 5-alpha (NEB, Cat-C2987P)
10	Etanol absoluto (al 99,9 %)	Sdfine chem, Cat-58051 L05
11	Aislamiento de ADN plasmídico	kit QiaPrep spin miniprep (QIAGEN, Cat-27104)
12	Kit de elución de ADN	kit QIAGEN Gel Extraction (Cat-20021 y 20051)

13	Enzimas de restricción	EcoRI-HF (NEB, Cat-R3101) Hind III-HF (NEB, Cat-R3104)
14	T4 ligasa	ADN ligasa T4 (NEB, Cat-M0202)

**Tabla 2: Medios y tampones usados en la presente divulgación**

S.N.º	Medios/tampones	Composición
1	Colorante de ADN de carga a 6X	4 g de sacarosa, 0,025 g de azul de bromofenol, preparado hasta 10 ml usando agua depurada.
3	Tampón de TAE a 50X	121 g de base de Tris, 28,6 ml de ácido acético glacial, 50 ml de EDTA (0,5 M) a pH 8, preparado hasta un volumen de 500 ml con agua depurada.

### Ejemplo 1: DISEÑO DE CONSTRUCCIONES CRISPR/CAS

5 El objetivo del presente ejemplo es diseñar un complejo CRISPR/Cas para la inactivación específica de los alelos de FUT8 y GMD.

#### 1.1 - Construcciones de CRISPR

10 La CRISPR se basa en una clase de endonucleasas guiadas por ARN conocidas como Cas9 del sistema inmunitario adaptativo microbiano hallado en *Streptococcus pyogenes*. La nucleasa Cas9 se dirige a sitios específicos en el genoma por ARN guía (ARNg). El complejo Cas9/ARNg se une a una secuencia diana de 20 pb que está seguida por un motivo de activación de protoespaciador (PAM) de 3 pb NGG o NAG en el gen específico que se necesita modificar (Jinek, 2012; Mali, 2013). Por tanto, la unión de este complejo completo genera roturas de cadena doble (DSB).

Una etapa crucial en la modificación dirigida del genoma en los loci genómicos que necesitan ser modificados, es la introducción de estas DSB. Una vez que se han introducido las DSB, se reparan bien mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación dirigida por homología (HDR).

20 Se sabe que la NHEJ introduce de forma eficaz mutaciones de inserción/delección (indels) que, a su vez, provocan la alteración de un marco de lectura traduccional de la secuencia codificante diana o en sitios de unión de factores de acción en trans en promotores o potenciadores. Por otro lado, la reparación mediada por HDR puede insertar mutaciones puntuales específicas o secuencias en el locus diana. Por tanto, la cotransfección de tipos celulares con vectores que expresan la nucleasa Cas9 y los ARNg dirigidos a un locus específico del gen pueden reducir la expresión de genes diana. La frecuencia esperada de mutaciones en estos sitios específicos varía de >1 % al 50 % (Sander 2014).

30 La selección de mutantes se realiza mediante cribado simple, usando secuenciación, sin el uso de la selección de marcadores de resistencia a fármacos. Con el fin de aumentar la especificidad de la alteración génica, la presente divulgación usa el mutante de Cas9 (D10A) que está guiado por dos ARN guía para un solo locus del gen y que introduce dos roturas de cadena simple o incisiones. Esto también reduce las oportunidades de uniones no específicas en otros sitios aleatorios. Se usa un vector que codifica la Cas9 D10A y los 2 ARNg para provocar la inactivación eficaz del gen.

35 Los loci genómicos de GMD y Fut8 se direccionan para delecciones específicas de secuencia a través de la tecnología CRISPR/CAS9 y generan sistemas de expresión de mamíferos defucosilados.

#### 1.2 - El proceso completo de obtención de la construcción CRISPR se compone de las siguientes etapas:

- 40 1. Diseño de CRISPR.
2. Diseño del cebador.
3. Síntesis de oligonucleótidos.
4. Transformación de construcciones de CRISPR pD1401 (ARNg 514-553), pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404) en placa de LB (caldo Luria) + ampicilina.
- 45 5. Inoculación de células transformadas (construcciones de CRISPR) en caldo LB con ampicilina.
6. Aislamiento del plásmido pD1401 (ARNg 514-553), pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404) de células DH10B o DH5alpha.
7. Transfección en células CHOK1; cribado y selección por ensayo de LCA.
- 50 8. Aislamiento de ADN genómico de clones seleccionados usando el kit QIAGEN DNeasy Blood & Tissue.
9. Cuantificación mediante espectrofotometría.
10. Optimización de la condición de la PCR.
11. Comprobación cruzada de la muestra de ADN genómico mediante PCR.
12. Electroforesis en gel de agarosa.
- 55 13. Amplificación por PCR usando polimerasa Phusion y adición de ADN por cola homopolimérica usando Taq polimerasa.
14. Elución de gel de producto de PCR usando el kit QIAGEN.

15. Clonación de TA usando el vector pTZ57R/T.

16. Transformación de muestra ligada pTZ57R/T+CRISPR(PCR) en células DH10B o DH5alpha.

17. Inoculación de células transformadas (pTZ57R/T+CRISPR(PCR)) en caldo LB con ampicilina.

5 18. Aislamiento de ADN plasmídico (pTZ57R/T+CRISPR(PCR)) de células DH5alpha y DH10B usando el kit de aislamiento de ADN plasmídico de QIAGEN.

19. Comprobación cruzada de la presencia de inserciones por digestión de restricción (sitios).

20. Secuenciación de cebadores; y

21. Confirmación de las INDEL mediante secuenciación.

10 La Figura 1A de la presente divulgación representa la secuencia codificante de Fut8 y la secuencia de la proteína. La secuencia genómica de FUT8 se analiza a partir de la secuencia de la secuencia de la base de datos, ID de secuencia NW 003613860. La secuencia genómica de FUT8 abarca 570171 - 731804 bases y contiene once exones representados como E1 a E11 en la figura. También se indican las posiciones de los pares de bases para cada exón. E1, E2 y parte de E3 constituyen la región no traducida en la secuencia de aguas arriba, y parte de E11 es  
15 también parte de la región no traducida. Las regiones traducidas se describen como CDS 1 a CDS 9. La longitud de cada CDS se indica debajo del número de la CDS. Las CD1 a CDS9 codifican las secuencias de aminoácidos que varían de 38 aminoácidos a 105 aminoácidos.

20 **El ARNm de la fucosiltransferasa 8 (Fut8) (3126 pb) de *Cricetulus griseus* o de hámster chino** deriva de la secuencia de referencia del NCBI:

XM\_003501735.1, también representada por la SEQ ID NO: 1 de la presente divulgación.

Los exones alternativos se representan en mayúsculas y en minúsculas.

25 La estructura de la proteína Fut8 se estudia a fondo para entender el dominio funcional de la enzima. La estructura cristalina tridimensional de la enzima FUT8 reveló 15 hebras y 16 hélices.

La secuencia de aminoácidos del gen FUT8 se proporciona en la Figura 2A.

30 Las regiones de unión de CRISPR/Cas se diseñan de tal forma que la especificidad del sitio de reconocimiento es alta y, al mismo tiempo, el complejo CRISPR/Cas lleva a cabo la rotura de cadena simple de ADN pretendida.

35 En una divulgación, se usa Cas9n (mutante D10A de la endonucleasa Cas9) para el complejo CRISPR/Cas. La endonucleasa Cas9n provoca la rotura de cadena simple de ADN. Los dos sitios de reconocimiento de CRISPR (sitio de reconocimiento 5' y sitio de reconocimiento 3' están espaciados por una distancia de 5 pares de bases, lo que permite dos roturas de cadena simple en estrecha proximidad. Las roturas resultantes permiten el proceso de NHEJ de reparación de rotura de ADN que introduce mutaciones en esta región.

40 La construcción CRISPR tiene dos únicas secuencias de reconocimiento de CRISPR de 20 pares de bases flanqueadas por andamiajes de ARNg en tándem con elementos promotores de U6 para la expresión eficaz de las secuencias de ARNg. El diseño único permite que un solo vector exprese dos andamiajes de ARNg separados y dos secuencias únicas de reconocimiento de CRISPR en el ADN genómico.

45 La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen Cas9 de tipo silvestre se proporciona en las SEQ ID NO: 3 y 4 respectivamente.

La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la endonucleasa Cas9n de se proporciona en las SEQ ID NO: 5 y 6 respectivamente.

50 El diseño de CRISPR/Cas se coloca únicamente en la cadena beta 2 diana y en la región de la hélice 3H2 incorporando roturas de cadena simple. El diseño es compatible con dos roturas de cadena simple en estrecha proximidad, proporcionando de ese modo una mayor especificidad de reconocimiento de la diana ta que el mecanismo de reparación de NHEJ solo tiene lugar en estas localizaciones genómicas. Las roturas de cadena simple no específicas, si se crean, normalmente se reparan mediante recombinación homóloga, que es precisa y raramente crea ninguna mutación.

55 El principal objetivo de la presente divulgación es crear mutaciones en el dominio catalítico de N-terminal, la cadena beta 2 y la hélice 3H2. La inserción y las deleciones a través de CRISPR/Cas en esta posición hace que la enzima FUT8 sea no funcional. Además, las mutaciones de desplazamiento del marco también provocan codones de parada prematura de la traducción, el plegamiento de Rossmann que está aguas abajo de esta región no se expresa entonces. Los restos de aminoácidos en el plegamiento de Rossmann tales como Arg 365, Arg366, Asp-368, Lys-369, Glu-373, Tyr-382, Asp-409, Asp-410, Asp-453 y Ser-469 son muy importantes para la funcionalidad de FUT8. La enzima truncada será no funcional y lleva a una línea celular de inactivación de fucosa.

60 La Figura 2A de la presente divulgación representa la secuencia de aminoácidos de Fut8 en CHOK1. Se proporciona la secuencia de aminoácidos completa del gen FUT8. La secuencia de aminoácidos de cada CDS se indica con puntas de flecha grandes. Las flechas pequeñas indican los aminoácidos críticos presentes en el Exón 7 (CDS5) que

se direccionan en el gen Fut8 por construcciones de CRISPR.

Los datos de secuenciación aleatoria del genoma celular completo de CHO con número de registro NW 003613860 para el gen Fut8 se corresponde con un total de 161634 pb. El número de registro de Pubmed para la región codificante de ARNm del gen Fut8 es XM\_003501735.1. La secuencia de ARNm, tal como se muestra en la figura 1A, abarca la secuencia codificante completa para la expresión del producto del gen FUT8, que es  $\alpha$ -1,6 fucosiltransferasa.

La herramienta de alineación Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>) se usa para identificar los exones en el ADN mediante alineación de la secuencia de ARNm con la secuencia de ADN genómico. Se identificaron un total de 11 exones con los límites que se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3: Caracterización de ARNm de Fut8**

EXÓN	Coordenadas genómicas	Coordenadas del ARNm	Longitud (nucleótidos)
Exón 1	570171-570263	1-93	93
Exón 2	593436-593529	94-187	94
Exón 3	608623-609050	188-615	428
Exón 4	634802-634917	616-731	116
Exón 5	635025-635187	732-894	163
Exón 6	657197-657311	895-1009	115
Exón 7	673387-673624	1010-1247	238
Exón 8	709381-709627	1248-1494	247
Exón 9	710960-711136	1495-1671	177
Exón 10	721655-721805	1672-1822	151
Exón 11	730501-731804	1823-3126	1304

Se han confirmado las funcionalidades de la enzima FUT8 a través de estudios de mutagénesis de sitio dirigido de restos de aminoácidos críticamente importantes en el dominio catalítico.

Se observa una identidad del 100 % entre el ADN genómico y la secuencia de ARNm. La organización del gen Fut8 que muestra los 11 exones y la posición de los ARNg que direccionan el exón 7 se muestra en la figura 1A de la presente divulgación. Se diseña la construcción con la nucleasa Cas9 mutante (Cas9n), que crea roturas de cadena simple (incisión) en el sitio diana. Se diseñan dos ARNg en estrecha proximidad en el exón 7 para crear dos incisiones para la reparación eventual de ADN.

En la presente divulgación, los sitios diana de la tecnología de CRISPR/Cas9 se localizan en los primeros pocos exones del gen Fut8. Esto se hace para evitar la fucosilación parcial que puede estar causada por una enzima truncada o parcialmente funcional.

La secuencia de nucleótidos del exón 7 (CDS 5) de Fut8 está representada por la SEQ ID NO: 7 de la presente divulgación.

AATCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
CAGCGAACACTCATCTTGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGA  
GACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGG  
ACACTGGTCAG

La secuencia de aminoácidos del exón 7 (CDS 5) de Fut8 de la célula CHO está representada por la SEQ ID NO: 8 de la presente divulgación. Las posiciones de aminoácidos direccionadas en la proteína/secuencia del péptido están subrayadas.

NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLLESQNWRYATGG  
WETVFRPVSETCTDRSGLSTGHWS

De forma similar a la estrategia descrita anteriormente para el gen Fut8, la herramienta de alineación Spidey

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>) se usa para identificar los exones de GMD en el ADN genómico mediante alineación de la secuencia de ARNm de GMD con la secuencia de ADN genómico. Se han identificado un total de 10 exones con una región no traducida en 5' y una cola de poli A y se tabulan en la Tabla 4.

5 La organización del gen GMD que muestra los 10 exones se proporciona en la Tabla 4 de la presente divulgación. Las otras dianas de CRISPR/Cas en el gen GMD, que se consideran para el direccionamiento también se proporcionan en la Tabla 6.

**Tabla 4: Caracterización de ARNm de GMD**

EXÓN	Coordenadas genómicas	Coordenadas del ARNm	Longitud (nucleótidos)
Exón 1	1-31	228-258	31
Exón 2	7779-7884	259-364	106
Exón 3	9961-10070	365-474	110
Exón 4	123180-123357	475-652	178
Exón 5	125698-125801	653-756	104
Exón 6	147875-148025	757-907	151
Exón 7	324508-324615	908-1015	108
Exón 8	346684-346784	1016-1116	101
Exón 9	441581-441654	1117-1190	74
Exón 10	441819-442215	1191-1587	397

10 La secuencia de nucleótidos del exón 3 de GMD está representada por la SEQ ID NO: 9 de la presente divulgación.

ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAATCATCA  
ATGAAGTCAAACCTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCAGAGCCATGTCAAG

15 La secuencia de nucleótidos del exón 4 de GMD está representada por la SEQ ID NO: 10 de la presente divulgación.

ATTTCTTTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTGATGGAGTTGGCACCTTGCGG  
CTTCTGGATGCAATTAAGACTTGTGGCCTTATAAATTCTGTGAAGTTCTACCAGGCCT  
CAACTAGTGAAGTGTATGGAAAAGTGCAAGAAATACCCAGAAAGAGACCACCCCT  
TTCTATCCAAGGTCGCCCTATG

20 Las posiciones de aminoácidos direccionadas en la proteína/secuencia del péptido están en negrita (figura 2B). La secuencia de aminoácidos del exón 3 de GMD está representada por la SEQ ID NO: 11 de la presente divulgación.

MKLHYGDLTDSTCLVKIINEVKPTEIYNLGAQSHVK

25 La secuencia de aminoácidos del exón 4 de GMD está representada por la SEQ ID NO: 12 de la presente divulgación.

ISFDLAEYTADV DGVGTLRLLDAIKTCGLINSVKFYQASTSELYGKVQEIPKETTTPFYPR  
SPY

30 **1.3 - Secuencia de interés en el gen Fut8 para el direccionamiento usando CRISPR**

En el exón 7 del gen Fut8, las secuencias proporcionadas a continuación se usan para la unión a ADN diana.

35 La secuencia de reconocimiento 1 de CRISPR se representa por la SEQ ID NO 13.

AATTGGCGCTATGCTACTGGAGG

El ARNg1 -está representado por la SEQ ID NO: 14.

AAUUGGCGCUAUGCUACUGGAGG

La secuencia de reconocimiento 2 de CRISPR se representa por la SEQ ID NO 15.  
CCAGCGAACACTCATCTTGGAAT

5

El ARNg2 -está representado por la SEQ ID NO: 16.  
CCAGCGAACACUCAUCUUGGAAU

10 Se han diseñado múltiples sitios posibles para CRISPR/Cas, todos a lo largo de las secuencias genómicas de FUT8 y GMD. La siguiente tabla indica sitios importantes en las secuencias genómicas de FUT8.

Tabla 5: Secuencias de reconocimiento de CRISPR (ARNg) diseñadas para la secuencia del gen FUT8

Posición del exón	SEQ ID NO	Nombre del locus	Secuencia de ADN de reconocimiento de CRISPR/Cas (5' a 3')
Exón 3	SEQ ID NO: 17	ARNg 520-558	TGACCCACCCCTGACCCATTCTAGCAGAGAACTCTCCAAGATTC TTGCAAAGCTGGAGC
Exón 3	SEQ ID NO: 18	ARNg 549-590	TCTCCAAGATTCTTGCAAAGCTGGAGCGCTTAAAAACAACA AAATGAAAGACTTGAGGAGA
Exón 4	SEQ ID NO: 19	ARNg 687-731	AGGCCAAAGAAACAGATTGAAAAATTACAAGAAACAAAGCTAG GAATG
Exón 7	SEQ ID NO: 20	ARNg 1019-1057	AATCCAAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAAGCTGGTATGTA ATATCAACAAGGCTG
Exón 7	SEQ ID NO: 21	ARNg 1128-1168	GCACCCAGCGAACACTCATCTTTGGAATCTCAGAAATTGGCGC TATGCTACTGGAGGATG
Exón 7	SEQ ID NO: 22	ARNg 1199-1238	AGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCT CCACTGGACACTGGTCA
Exón 7	SEQ ID NO: 23	ARNg 1120-1176	CACCCAGCGAACACTCATCTTTGGAATCTCAGAAATTGGCGCT ATGCTACTGGAGGATG
Exón 8	SEQ ID NO: 24	ARNg 1331-1369	TTACCCCTTGGCTGTACCAGAAAGACCTTGCAGATCGACTCCT GAGAGTCCATGGTGA
Exón 8	SEQ ID NO: 25	ARNg 1343-1385	GTACCAGAAAGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATG GTGATCCTGCAGTGTGG
Exón 8	SEQ ID NO: 26	ARNg 1351-1389	AGACCTTGCAGATCGACTCCTGAGAGTCCATGGTATCCTG CAGTGTGGTGGGTAT
Exón 8	SEQ ID NO: 27	ARNg 1426-1468	GATCCGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAAATAGAAGAA ACCACCAAGAAAGCTTGGCTT
Exón 8	SEQ ID NO: 28	ARNg 1430-1468	CGTCCACAACCTTGGCTGGAAAGGGAAAATAGAAGAAACCA CCAAGAAAGCTTGGCTT

Exón 11	SEQ ID NO: 29	ARNg 1868-1909	CATCCTGATGCCCTCTGCAAAACITTCACATTCCTTTAGATGACAT CTACTATTTTGGAGGCCA
Exón 11	SEQ ID NO: 30	ARNg 1868-1906	CATCCTGATGCCCTCTGCAAAACITTCACATTCCTTTAGATGACAT CTACTATTTTGGAGG
Exón 11	SEQ ID NO: 31	ARNg 1977-1936	CAACCAGATTGCAGTTTATCCCTCACCAACCTCGAACTAAAG AGGAAATCCCCCATGGAAC
Exón 11	SEQ ID NO: 32	ARNg 1991-2032	GAACTGGAGATATCATTTGGTGTGGCTGGAAACCATTTGGA ATGGTTACTCTAAAGGTGT
Exón 11	SEQ ID NO: 33	ARNg 2020-2059	AAACCATTTGGAATGGTTACTCTAAAGGTGTCAACACAGAAAA CTAGGAAAAACAGGCCT
Exón 11	SEQ ID NO: 34	ARNg 1961-2001	CAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCATGGAAACCTGGAG ATATCATTTGGTGTGGCTG
Exón 11	SEQ ID NO: 35	ARNg 1957-1996	TCACCAACCTCGAACTAAAGAGGAAATCCCCCATGGAACCT GGAGATATCATTTGGTGT
Exón 11	SEQ ID NO: 36	ARNg 1982-2020	ATCCCCATGGAAACCTGGAGATATCATTTGGTGTGGCTGGAA ACCATTTGGAATGGTTA

Todos estos sitios son únicos y se usan para crear una posible estrategia de inactivación del gen en CHO y otras líneas celulares. Todas las secuencias proporcionadas en la tabla anterior se representan en la dirección 5' a 3'. La correspondiente secuencia diana específica de ARNcr de 20 pares de bases provendrá de la secuencia de reconocimiento de CRISPR proporcionada en cada diseño mencionado en la tabla 5 anterior.

5 La Tabla 5 de la presente divulgación enumera diferentes secuencias diana de Fut8 que se consideran para el direccionamiento de inactivación por CRISPR. Inicialmente se consideraron un total de veinte secuencias diferentes. Se asegura que ninguno de los ARNg se extienda a un límite exón-intrón ya que esto puede producir la inactivación de los ARNg. Basándose en esta técnica, se elige un tramo de 57 pb en el exón 7 como la diana para el objetivo de inactivación mediada por CRISPR/Cas. Este incluye dos ARNg, uno en cada cadena que provoca dos roturas de cadena simple.

15 La secuencia diana en el gen Fut8 que se usa en una divulgación del presente método se muestra a continuación en la figura 3B de la presente divulgación como el ARNg 1120-1176. Los sitios de escisión se indican con una flecha. La distancia entre los dos ARNg es de 5 bases. La secuencia de reconocimiento de ARNg 1120-1176 está subrayada en la Figura 3B. El correspondiente fragmento sintetizado se incorpora en el vector pD1401 y se nombra como ARNg 514-553 de pD1401, cuyas características se describen posteriormente en la divulgación.

20 Este método de la presente divulgación usa Cas9n (mutante de nickasa) en el direccionamiento de la secuencia genómica de Fut8, exón 7 con el sistema CRISPR/Cas. La endonucleasa Cas9n genera roturas de cadena simple (SSB, del inglés *single strand break*) en la cadena opuesta de ADN. Las secuencias de reconocimiento de CRISPR/Cas en las cadenas superior e inferior están subrayadas. Los correspondientes sitios de rotura de cadena simple se indican con las puntas de las flechas negras. Las tres secuencias de nucleótidos PAM se indican en negrita.

25 En la presente divulgación, se usa uno de los diseños para el direccionamiento en el ARNg 1120-1176 del exón 7. La construcción del vector CRISPR/Cas para este diseño se nombra como ARNg (514-553) de pD1401.

30 La secuencia de reconocimiento de CRISPR de 5' y 3' se indica en pequeño y en cursiva, se reconocen dos sitios separados complementarios a esta secuencia de reconocimiento en la secuencia genómica de FUT8. La secuencia representada en negrita indica la secuencia de andamiaje de ARNg para la unión del complejo CRISPR/Cas.

SEQ ID NO: 100 - ARNg + andamiaje para el exón 7 de Fut8

*attccaagatgagtggttcgc***GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG  
GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT  
TTTGCTCCGCGGCACGAGAACTCAAAGCCCCGGGGCCTGGGTCCCACG  
CGGGGTCCCTTACCCAGGGTGCCCCGGGCGCTCATTTGCATGTCCCAC  
CCAACAGGTAAACCTGACAGGTCATCGCGGCCAGGTACGACCTGGCG  
GTCAGAGCACCAAACATACGAGCCTTGTGATGAGTTCCGTTGCATGAA  
ATTCTCCCAAAGGCTCCAAGATGGACAGGAAAGGGCGCGGTTCGGTC  
ACCGTAAGTAGAATAGGTGAAAGACTCCCGTGCCTTATAAGGCCTGTG  
GGTGACTTCTTCTCACCG*gaattggcgctatgctactgg***GTTTTAGAGCTAGAAA  
TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG  
CACCGAGTCGGTGC****

40 Secuencia de reconocimiento de CRISPR en 5' en el ADN sintetizado a partir de ADN2.0 SEQ ID NO: 37  
ATTCCAAGATGAGTGTTTCGC

Secuencia de ARNcr específica de diana (dirección 5' a 3'): SEQ ID NO: 38  
AUUCCAAGAUGAGUGUUCGC

45 Secuencia de reconocimiento de CRISPR en 3' en el ADN sintetizado a partir de ADN2.0- SEQ ID NO: 39

AATTGGCGCTATGCTACTGG

Secuencia de ARNcr específica de diana (dirección 5' a 3'): SEQ ID NO: 40

AAUUGGCGCUAUGCUACUGG

5 ARNg de andamiaje de ADN2.0-

**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT  
CAACTTGAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC**

10 El mapa de construcción se proporciona en la figura 3A y se marcan las regiones importantes de la secuencia.

**1.4 - DISEÑO DE LA CONSTRUCCIÓN DE CRISPR DE GMD**

15 La Figura 9B de la presente divulgación proporciona el locus genómico de GMD y las secuencias de reconocimiento de CRISPR.

Se obtuvieron de Pubmed los datos de secuenciación aleatoria del genoma celular completo de CHO con número de registro NW 003613635.1 para el locus del gen GMD que consiste en 442215 pb. El número de registro de Pubmed para la región codificante de ARNm del gen GMD es NM 001246696.1.

20 GMD es un miembro de la subfamilia modificadora de NDP-azúcar de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR). Como miembro de esta subfamilia, GMD se une a su cofactor NADP (H) en la parte de N-terminal de la molécula en la que está presente una región común rica en glicina. La tríada catalítica se ha identificado como Tyr-XXX-Lys y Ser/Thr, que son todas importantes para la catálisis. El análisis estructural de GMD de E. coli sugiere que la molécula activa está en configuración dimérica. Mientras que el homólogo de *Arabidopsis thaliana* es tetramérico, y el sitio de unión de NADP(H) está íntimamente implicado en la creación de la superficie de contacto del tetrámero. Lo más probable es que la forma funcional de la enzima GMD en eucariotas consista en la configuración tetramérica.

30 Las regiones de unión de CRISPR/Cas se diseñan de tal forma que la especificidad del sitio de reconocimiento es alta y, al mismo tiempo, el complejo CRISPR/Cas lleva a cabo la rotura de cadena simple de ADN pretendida.

35 En una divulgación, se usa Cas9n (mutante D10A de la endonucleasa Cas9) para el complejo CRISPR/Cas. La endonucleasa Cas9n provoca la rotura de cadena simple de ADN. Los dos sitios de reconocimiento de CRISPR (sitio de reconocimiento 5' y sitio de reconocimiento 3' están espaciados por una distancia de 5 pares de bases, lo que permite dos roturas de cadena simple en estrecha proximidad. Las roturas resultantes permiten el proceso de NHEJ de reparación de rotura de ADN que introduce mutaciones en esta región.

40 La construcción CRISPR tiene dos únicas secuencias de reconocimiento de CRISPR de 20 pares de bases flanqueadas por andamiajes de ARNg en tándem con elementos promotores de U6 para la expresión eficaz de las secuencias de ARNg. El diseño único permite que un solo vector exprese dos andamiajes de ARNg separados y dos secuencias únicas de reconocimiento de CRISPR en el ADN genómico.

45 El diseño de CRISPR/Cas se coloca únicamente para dirigir el motivo YGDLTDSTCLVK y el motivo DLAEYT responsable de la zona de contacto del tetrámero de la estructura proteica multimérica funcional de GMD. Las dos roturas de cadena simple inducidas por la endonucleasa Cas9n en esta región permite la reparación de ADN mediada por NHEJ. Las mutaciones incorporadas durante la reparación de ADN dan como resultado una mutación de desplazamiento del marco, delección, inserción así como codones de parada prematura. Tal mutación no solo altera el motivo crítico para la tetramerización, sino que también crea mutaciones aguas abajo del resto Ser85, que está implicado en el mantenimiento de interacciones de los monómeros en la configuración tetramérica. El diseño es compatible con dos roturas de cadena simple en estrecha proximidad, proporcionando de ese modo una mayor especificidad de reconocimiento de la diana ta que el mecanismo de reparación de NHEJ solo tiene lugar en estas localizaciones genómicas. Las roturas de cadena simple no específicas, si se crean, normalmente se reparan mediante recombinación homóloga, que es precisa y raramente crea ninguna mutación.

50 La Figura 1B de la presente divulgación representa la organización genómica de GMD en CHOK1.

55 Se proporciona la secuencia de aminoácidos completa del gen GMD en la figura 2B. La secuencia de aminoácidos de cada CDS se indica con puntas de flecha grandes. Las dos regiones diana de CRISPR están subrayadas en el exón 3 y en el exón 4, que se direccionan en el gen GMD. Cada exón está representado con marcas de flechas. Las líneas finas indican los sitios de reconocimiento de CRISPR para la localización de roturas de cadena simple y la línea gruesa indica el sitio de reconocimiento de CRISPR para la localización de la rotura de cadena doble.

60 Se usan os estrategias diferentes para la inactivación génica, una es el uso del mutante Cas9 (Cas9n) que genera roturas de cadena simple (SSB) y la segunda es el uso de Cas9 de tipo silvestre que genera roturas de cadena

doble (DSB).

**En el locus del exón 3 de GMD,**

5 El método de la presente divulgación usa Cas9n (mutante de nickasa) en el direccionamiento de la secuencia genómica de GMD, exón 3 con el sistema CRISPR/Cas. La endonucleasa Cas9n genera roturas de cadena simple (SSB, del inglés *single strand break*) en la cadena opuesta de ADN. La construcción se nombra como pD1401 (ARNg 167-207) y se representa por la Figura 4A de la presente divulgación.

10 La secuencia de reconocimiento de CRISPR de 5' y 3' se indica en pequeño y en cursiva, se reconocen dos sitios separados complementarios a esta secuencia en la secuencia genómica de GMD. La secuencia representada en negrita indica la secuencia de andamiaje de ARNg para la unión del complejo CRISPR/Cas.

SEQ ID NO: 101 -

*actaggcaggtgctgctcggt***GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT  
TTTTGCTCCGCGGCACGAGAACTCAAAGCCCCGGGGCCTGGGTCCCAC  
GCGGGGTCCCTTACCCAGGGTGCCCCGGGCGCTCATTGTCATGTCCCA  
CCCAACAGGTAAACCTGACAGGTCATCGCGGCCAGGTACGACCTGGC  
GGTCAGAGCACCAAACATACGAGCCTTGTGATGAGTTCCGTTGCATGA  
AATTCTCCCAAAGGCTCCAAGATGGACAGGAAAGGGCGCGGTTCCGGT  
CACCGTAAGTAGAATAGGTGAAAGACTCCCGTGCCTTATAAGGCCTGT  
GGGTGACTTCTTCTCACCG*catcaatgaagtcaaaccta***GTTTTAGAGCTAGA  
AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGT  
GGCACCGAGTCGGTGC****

15

Secuencia de reconocimiento de CRISPR en 5' en el ADN sintetizado a partir de ADN2.0 = SEQ ID NO: 41  
ACTAGGCAGGTGCTGTCGGT

20

Secuencia de ARNcr específica de diana (dirección 5' a 3'): SEQ ID NO: 42  
ACUAGGCAGGUGCUGUCGGU

Secuencia de reconocimiento de CRISPR en 3' en el ADN sintetizado a partir de ADN2.0 - SEQ ID NO: 43  
CATCAATGAAGTCAAACCTA

25

Secuencia de ARNcr específica de diana (dirección 5' a 3'): SEQ ID NO: 44  
CAUCAUGAAGUCAACCUA

**En el locus del exón 4 de GMD,**

30

el exón 4 del gen GMD se direcciona con la endonucleasa Cas9 de tipo silvestre. Esta Cas9 de tipo silvestre genera roturas de cadena doble (DSB) en el sitio diana. La construcción se nombra como pD1301 (ARNg 404) y se representa por la Figura 4B de la presente divulgación.

35

La secuencia de reconocimiento de CRISPR se indica en pequeño y en cursiva. La secuencia de ADN genómico de cadena doble se reconoce basándose en esta secuencia por el sistema CRISPR/Cas. La secuencia representada en negrita indica la secuencia de andamiaje de ARNg para la unión del complejo CRISPR/Cas.

SEQ ID NO: 102-

40

*agttggcaccttgcggttc***GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG  
GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC**

Secuencia de reconocimiento de CRISPR en el ADN sintetizado a partir de ADN2.0 - SEQ ID NO: 45-  
AGTTGGCACCTTGCGGCTTC

- 5 Secuencia de ARNcr específica de diana (dirección 5' a 3'): SEQ ID NO: 46  
AGUUGGCACCUUGCGGCUUC

**Secuencias de reconocimiento de CRISPR para el gen GMD**

- 10 La siguiente tabla representa secuencias de reconocimiento de CRISPR/Cas a lo largo de secuencias codificantes de GMD para posibles sitios de rotura de cadena simple. Cualquiera de estas secuencias de reconocimiento se usa para la rotura de cadena simple mediada por la endonucleasa Cas9n y la estrategia de reparación del sistema CRISPR/Cas para inactivar el gen GMD.

- 15 **La tabla 6 proporciona todas las secuencias de CRISPR para GMD**

Posición del exón	SEQ ID NO	Nombre del locus	Secuencia de ADN de reconocimiento de CRISPR/Cas (5' a 3')
Exón 3	SEQ ID NO: 47	ARNg 394-434	GACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAATCATCAATG AAGTCAAACCTACAGAGA
Exón 3	SEQ ID NO: 48	ARNg 394-436	GACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAATCATCAATG AAGTCAAACCTACAGAGATC
Exón 3	SEQ ID NO: 49	ARNg 384-422	GCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAA ATCATCAATGAAGTCA
Exón 4	SEQ ID NO: 50	ARNg 541-580	CTTCTGGATGCAATTAAGACTTGTGGCCTTATAAATTCTGT GAAGTTCTACCAGGCC
Exón 4	SEQ ID NO: 51	ARNg 541-581	CTTCTGGATGCAATTAAGACTTGTGGCCTTATAAATTCTGT GAAGTTCTACCAGGCCT
Exón 4	SEQ ID NO: 52	ARNg 531-571	CACCTTGCGGCTTCTGGATGCAATTAAGACTTGTGGCCTTA TAAATTCTGTGAAGTTC
Exón 4	SEQ ID NO: 53	ARNg 565-603	GGCCTTATAAATTCTGTGAAGTTCTACCAGGCCTCAACTAG TGAAGTGTATGGAAA
Exón 5	SEQ ID NO: 54	ARNg 693-735	TGCCTATGGATTGTAGTGAACCTTCGAGAGGCTTATAATC TCTTTGCGGTGAACGGCAT
Exón 6	SEQ ID NO: 55	ARNg 828-866	TTACCTTGACAACCTGGAATGTTTCAGTTTGGGAAATCTGG ACGCCAAACGAGACT
Exón 6	SEQ ID NO: 56	ARNg 829-871	TACCTTGACAACCTGGAATGTTTCAGTTTGGGAAATCTGGA CGCCAAACGAGACTGGGGC
Exón 7	SEQ ID NO: 57	ARNg 916-956	TGGCTGATGTTACAAAATGATGAACCAGAGGACTTTGTCAT AGCTACTGGGGAAGTTC
Exón 10	SEQ ID NO: 58	ARNg 1345-1387	AACCCCTCGACTGCCTGTGTCGTCCCCACAGCTAAGAGCTGG GCCAC
Exón 10	SEQ ID NO: 59	ARNg 1345-1386	AACCCCTCGACTGCCTGTGTCGTCCCCACAGCTAAGAGCTGG GCCA
Exón 10	SEQ ID NO: 60	ARNg 1393-1355	TGCCTGTGTCGTCCCCACAGCTAAGAGCTGGGCCACAGGTT TGTGGCACCAGGAC
Exón 10	SEQ ID NO: 61	ARNg 1243-1285	AACCCCAACGCCTGAGCACCTCTACAAAAAATTCGCGAGA CATGGACTATGGTGCAGAGC
Exón 10	SEQ ID NO: 62	ARNg 1244-1285	ACCCCAACGCCTGAGCACCTCTACAAAAAATTCGCGAGAC ATGGACTATGGTGCAGAGC

Exón 10	SEQ ID NO: 63	ARNg 1267-1228	GAGCTCATGAGAACCAACCCCAACGCCTGAGCACCTCTAC AAAAAATTCGCGAGACA
Exón 10	SEQ ID NO: 64	ARNg 1242-1280	CAACCCCAACGCCTGAGCACCTCTACAAAAAATTCGCGAG ACATGGACTATGGTGC
Exón 10	SEQ ID NO: 65	ARNg 1330-1371	AGACCATCGACCATAAACCCCTCGACTGCCTGTGTGTCGTC ACAGCTAAGAGCTGGGCC
Exón 10	SEQ ID NO: 66	ARNg 1280-1238	GAACCAACCCCAACGCCTGAGCACCTCTACAAAAAATTCG CGAGACATGGACTATGGTGC
Exón 10	SEQ ID NO: 67	ARNg 1330-1372	AGACCATCGACCATAAACCCCTCGACTGCCTGTGTGTCGTC ACAGCTAAGAGCTGGGCCA
Exón 10	SEQ ID NO: 68	ARNg 1415-1457	ACACTCCAGAGCTAAGGCCACTTCGCTTTTGTCAAAGGCTC CTCTGAA
Exón 10	SEQ ID NO: 69	ARNg 1542-1580	AGTCTTGAGATTGTTTTCTCTTTTCTATTAAATGATCTTT CTATGAACCAGC
Exón 10	SEQ ID NO: 70	ARNg 1320-1361	CCACTCCTGAGACCATCGACCATAAACCCCTCGACTGCCTGT GTCGTCCCCACAGCTA

En este caso, se diseñan un total de diecinueve secuencias diana en la secuencia del gen GMD para los sitios de reconocimiento de CRISPR. Todas las secuencias se representan en la dirección 5' a 3'; la correspondiente secuencia diana específica de ARNcr de 20 pares de bases provendrá de la secuencia de reconocimiento de CRISPR proporcionada en cada diseño mencionado en la tabla 6 anterior.

Uno de los diseños mencionados anteriormente, El ARNg 394-434, se usó para crear el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) para la transfección de células CHOK1. El complejo CRISPR/Cas crea dos roturas de cadena simple en el ADN en la cadena complementaria de la secuencia codificante reconocida del gen GMD. La reparación exitosa de ADN en el sitio diana crea un gen GMD no funcional y, por lo tanto, se desarrollan líneas celulares CHOK1 con inactivación de fucosa. Las características de pD1401 (ARNg 167-207) se describen posteriormente en la divulgación.

Aunque la presente divulgación usa uno de los diseños, uno cualquiera de los sitios de reconocimiento de CRISPR mencionados anteriormente crea un gen GMD no funcional. Por lo tanto, cualquiera de estos posibles sitios solo o en combinación se usa para el desarrollo de la línea celular CHOK1 con inactivación de fucosa.

La secuencia diana en el exón 3 de GMD que se usa en una divulgación del presente método se menciona en la tabla 6 como ARNg 394-434. La Figura 4C describe la secuencia de reconocimiento de CRISPR. Los sitios de escisión se indican con una flecha. La distancia entre los dos ARNg es de 6 bases. La secuencia de ARNg 394-434 está subrayada en la Figura 4C. El correspondiente fragmento sintetizado se incorpora en el vector pD1401 y se nombra como ARNg 167-207 de pD1401, cuyas características se describen posteriormente en la divulgación. Este método de la presente divulgación usa Cas9n (mutante de nickasa) en el direccionamiento de la secuencia genómica de GMD, exón 3 con el sistema CRISPR/Cas. La endonucleasa Cas9n genera roturas de cadena simple (SSB, del inglés *single strand break*) en la cadena opuesta de ADN.

La siguiente tabla representa secuencias de reconocimiento de CRISPR/Cas a lo largo de secuencias codificantes de GMD para posibles sitios de rotura de cadena doble. Cualquiera de estas secuencias de reconocimiento se usa para la rotura de cadena simple mediada por la endonucleasa Cas9 de tipo silvestre y la estrategia de reparación del sistema CRISPR/Cas para inactivar el gen GMD.

**Tabla 7** - secuencias de reconocimiento de CRISPR/Cas a lo largo de secuencias codificantes de GMD para posibles sitios de rotura de cadena doble

Posición del exón	SEQ ID NO	Nombre del locus	Secuencia de ADN de reconocimiento de CRISPR/Cas (5' a 3')
Exón 3	SEQ ID NO: 71	ARNg 166	TGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAA
Exón 4	SEQ ID NO: 72	ARNg 299	ATGTTGATGGAGTTGGCACCTTGCGGCTT
Exón 4	SEQ ID NO: 73	ARNg 406	ACCCAGAAAGAGACCACCCCTTTCTATC

Exón 4	SEQ ID NO: 74	ARNg 366	AGGCCTCAACTAGTGAAGTGTATGGAAAA
Exón 4	SEQ ID NO: 75	ARNg 306	TGGAGTTGGCACCTTGC GGCTTCTGGATG
Exón 5	SEQ ID NO: 76	ARNg 483	TTGGATTGTAGTGAAGTTCGAGAGGCTT
Exón 5	SEQ ID NO: 77	ARNg 508	GCTTATAATCTCTTTGCGGTGAACGGCAT
Exón 6	SEQ ID NO: 78	ARNg 642	ACGCCAAACGAGACTGGGGCCATGCCAAG
Exón 9	SEQ ID NO: 79	ARNg 918	GCTCCAAGGCGCAGCAGAACTGAACTGG
Exón 10	SEQ ID NO: 80	ARNg 1016	AACCCCAACGCCTGAGCACCTCTACAAAA
Exón 10	SEQ ID NO: 81	ARNg 1096	ACTCCTGAGACCATCGACCATAAACCCCTC
Exón 10	SEQ ID NO: 82	ARNg 1017	ACCCCAACGCCTGAGCACCTCTACAAAA
Exón 10	SEQ ID NO: 83	ARNg 1015	CAACCCCAACGCCTGAGCACCTCTACAAA
Exón 10	SEQ ID NO: 84	ARNg 1103	AGACCATCGACCATAAACCCCTCGACTGCC
Exón 10	SEQ ID NO: 85	ARNg 1046	CTCTACAAAAAATTCGCGAGACATGGACT
Exón 10	SEQ ID NO: 86	ARNg 1174	GCACCAGGACGGGGACACTCCAGAGCTAA
Exón 10	SEQ ID NO: 87	ARNg 1211	TAAGGCCACTTCGCTTTTGTCAAAGGCTC
Exón 10	SEQ ID NO: 88	ARNg 1110	CGACCATAAACCCCTCGACTGCCTGTGTGCG
Exón 10	SEQ ID NO: 89	ARNg 1011	GAACCAACCCCAACGCCTGAGCACCTCTA
Exón 10	SEQ ID NO: 90	ARNg 1118	AACCCCTCGACTGCCTGTGTGTCGCCCA
Exón 10	SEQ ID NO: 91	ARNg 987	GAGGGAGATGGTGCAAGCCGATGTGGAGC
Exón 10	SEQ ID NO: 92	ARNg 1160	TAAGAGCTGGGCCACAGGTTTGTGGGCAC
Exón 10	SEQ ID NO: 93	ARNg 1167	TGGGCCACAGGTTTGTGGGCACCAGGACG

Se diseñaron veintitrés secuencias únicas (ARNg) de reconocimiento de CRISPR a lo largo de la secuencia del gen GMD. Todas las secuencias se representan en la dirección 5' a 3'; la correspondiente secuencia diana específica de ARNcr de 20 pares de bases provendrá de la secuencia de reconocimiento de CRISPR proporcionada en cada diseño mencionado en la tabla 7 anterior.

Uno de los diseños mencionados anteriormente, El ARNg 306, se usó para crear el complejo CRISPR/Cas pD1301 (ARNg 404) para la transfección de células CHOK1. El complejo CRISPR/Cas crea una rotura de cadena doble en el ADN en la secuencia codificante reconocida del gen GMD. La reparación exitosa de ADN en el sitio diana crea un gen GMD no funcional y, por lo tanto, se desarrollan líneas celulares CHOK1 con inactivación de fucosa.

Aunque uno de los diseños se usa en la presente divulgación, uno cualquiera de los sitios de reconocimiento de CRISPR mencionados anteriormente crea un gen GMD no funcional. Por lo tanto, cualquiera de estos posibles sitios solo o en combinación se usan para el desarrollo de la línea celular CHOK1 con inactivación de fucosa.

La secuencia diana en el exón 4 de GMD que se usa en una divulgación del presente método se muestra en la tabla 7 anterior como ARNg 306. La Figura 4D describe la secuencia de reconocimiento de CRISPR. Los sitios de escisión se indican con una flecha. El correspondiente fragmento sintetizado se incorpora en el vector pD1301 y se nombra como ARNg 404 de pD1301, cuyas características se describen posteriormente en la divulgación. Este método de la presente divulgación usa endonucleasa Cas9 de tipo silvestre en el direccionamiento de la secuencia genómica de GMD, exón 4 con el sistema CRISPR/Cas. La endonucleasa Cas9 de tipo silvestre genera roturas de cadena doble (DSB) en ambas cadenas de ADN.

### 1.5- Síntesis del complejo CRISPR/Cas

La tecnología CRISPR se basa en una clase de endonucleasas guiadas por ARN conocidas como Cas9 del sistema inmunitario adaptativo microbiano hallado en *Streptococcus pyogenes*. La nucleasa Cas9 se dirige a sitios específicos en el genoma por ARN guía (ARNg). Se deben introducir y/o expresar dos componentes en células o en un organismo para realizar la modificación del genoma basado en CRISPR: la nucleasa Cas9; y un "ARN guía" (ARNg).

Veinte secuencias de reconocimiento de nucleótidos en el extremo 5' del ARNg dirigen la Cas9 a un sitio de diana de ADN específico usando las reglas de alineación de bases complementarias de ARN-ADN. Estos sitios diana deben caer inmediatamente en 5' de una secuencia PAM que coincide con la forma convencional 5-NGG.

La presente divulgación usa dos tipos diferentes de endonucleasa Cas9 en la presente divulgación tal como se describe a continuación. En ambos casos se usa un solo vector de transfección que codifica el ARNg y la nucleasa, aumentando de este modo la eficacia de la transfección de las células CHOK1.

- 5 a) La nucleasa Cas9 de tipo silvestre se usa para el direccionamiento del gen GMD en el exón 4. La construcción permite la rotura de cadena doble (DSB) en el sitio dirigido.  
 b) Una nucleasa Cas9 mutante (D10A), conocida como Cas9n se usa para dirigir el locus del exón 3 de GMD y el locus del exón 7 de Fut8, las construcciones crean roturas de cadena simple en lugar de una rotura de cadena  
 10 doble en el ADN. Este diseño se centra en mejorar la especificidad de construcciones CRISPR/Cas.

En el caso de roturas de cadena simple, se direccionan dos sitios diana en el ADN en estrecha proximidad en donde tiene lugar la rotura de cadena simple o incisión en cadenas opuestas de ADN. De este modo, se recluta la maquinaria de reparación del ADN (NHEJ) para reparar el daño del ADN. El reclutamiento de dos complejos  
 15 ARNg/Cas9n en un intervalo específico para iniciar la reparación de ADN mejora la especificidad hacia el sitio dirigido. La unión no específica de solo uno de los complejos ARNg/Cas9n a sitios no relacionados provoca incisiones que normalmente se reparan a través de reparación basada en la recombinación homóloga con una tasa de mutación muy baja. Por lo tanto, esta estrategia aumenta la especificidad del direccionamiento del gen Fut8 y GMD.  
 20

Las regiones únicas de ambos genes se direccionan basándose en la información estructural de la enzima de tal forma que anulan la función catalítica de la enzima o mediante la alteración de una estructura de mayor orden.

Las características importantes de los vectores son,

- 25 a) **Cas9** - una nucleasa que primero se descubre como un componente del sistema CRISPR en *Streptococcus pyogenes* y se ha adaptado para su utilidad en células de mamífero. La Cas9 guiada por ARN es capaz de introducir de manera eficaz roturas precisas de cadena doble en loci genómicos endógenos en células de mamífero con alta eficacia.  
 30 **Cas9-D10A** - Un mutante D10A de nucleasa Cas9 (Cas9n) hace incisiones en cadena simple y se combina con un par de ARN guía de compensación complementarios a las cadenas opuestas de los loci genómicos diana. Esto ayuda a reducir la actividad fuera de diana observada con la Cas9 de tipo silvestre.  
 b) **Andamiaje de ARNg quimérico** - El andamiaje de ARN guía quimérico (ARNg) consiste en una región complementaria específica de diana de 20 nucleótidos, una estructura de ARN de unión a Cas9 de 42  
 35 nucleótidos, y un finalizador de la transcripción de 40 nucleótidos que proviene de *S. pyogenes* que dirige la nucleasa Cas9 al sitio diana para la modificación del genoma. En este caso hay dos andamiajes de ARNg, uno para cada ARNg.  
 c) **Kanamicina-r** - Un agente bactericida eficaz que inhibe la translocación ribosómica provocando de este modo errores de codificación. El gen que codifica para la resistencia a la Kanamicina es Neomicina fosfotransferasa II (NPT II/Neo). La *E. coli* transformada con el plásmido que contiene el gen de resistencia a la kanamicina se puede cultivar en medios que contienen 25 µg/ml de kanamicina.  
 40 d) **P CMV** - El promotor de CMV es un promotor constitutivo de mamíferos y media una fuerte expresión en diversos sistemas celulares.  
 e) **P\_hU6.1** - Promotor central humano A de tipo 3 para la expresión de ARN.  
 45

**1.6 - El proceso completo de obtención de la construcción CRISPR se compone de las siguientes etapas:**

22. Diseño de la diana de CRISPR.  
 23. Construcciones de vector con dos estructuras principales del vector separadas, a saber, los vectores pD1401  
 50 y pD1301 con inserción de ARNg.  
 24. Transformación de las construcciones de CRISPR pD1401 (ARNg 514-553), pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404) en células competentes de *E. coli* (DH10B o DH5alpha) y colocación en LB (Luria Bertani)-Agar suplementado con kanamicina.  
 25. Inoculación de células transformadas (construcciones de CRISPR) en caldo LB con kanamicina.  
 55 26. Aislamiento del plásmido de ADN pD1401 (ARNg 514-553), pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404) de células DH10B o DH5alpha.  
 27. Transfección en células CHOK1; cribado y selección por ensayo de LCA.  
 28. Aislamiento de ADN genómico de clones seleccionados usando el kit QIAGEN DNeasy Blood & Tissue.  
 29. Cuantificación mediante espectrofotometría.  
 60 30. Optimización de la condición de la PCR.  
 31. Comprobación cruzada de la muestra de ADN genómico mediante PCR.  
 32. Electroforesis en gel de agarosa.  
 33. Amplificación por PCR usando polimerasa Phusion y adición de ADN por cola homopolimérica usando Taq polimerasa.  
 65 34. Elución de gel de producto de PCR usando el kit QIAGEN.  
 35. Clonación de TA usando el vector pTZ57R/T.

36. Transformación de muestra ligada pTZ57R/T+CRISPR(PCR) en células DH10B o DH5alpha.
37. Inoculación de células transformadas (pTZ57R/T+CRISPR(PCR)) en caldo LB con ampicilina.
38. Aislamiento de ADN plasmídico (pTZ57R/T+CRISPR(PCR)) de células DH5alpha y DH10B usando el kit de aislamiento de ADN plasmídico de QIAGEN.
39. Comprobación cruzada de la presencia de inserciones por digestión de restricción.
40. Secuenciación de cebadores; y
41. Confirmación de las INDEL mediante secuenciación.

## Ejemplo 2: TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CON CONSTRUCCIONES TALEN

El presente ejemplo contiene un procedimiento para la transfección de células CHOK1 con construcciones CRISPR. También se proporciona la selección y confirmación de líneas celulares estables únicas para el desarrollo de líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8 usando la tecnología CRISPR y la selección de clones positivo por ensayo funcional basado en la citometría de flujo.

### Protocolo de transfección

La transfección se isoptimizó usando células CHOK1 de tipo adherente y de suspensión. Se usaron reactivos de transfección mediada por liposoma y liposoma modificado, por ejemplo, Lipofectamina 2000, Lipofectamina 3000, Lipofectamina LTX con reactivo PlusTM, MIRUS TransIT X2, MIRUS TransIT 2020, MIRUS TransIT 293, kit de transfección en CHO MIRUS TransIT. Se ensayó una concentración de ADN que varía de 0,5 µg a 5 µg para diversos periodos de incubación, por ejemplo, 4 horas, 24 horas y 48 horas. También se ensayaron múltiples proporciones de ADN frente a reactivo de transfección (µg : µl). Se logra una eficacia de transfección óptima usando una proporción de ADN frente a reactivo de transfección de 1:3, incubación de 24 horas y Lipofectamina LTX con reactivo PlusTM. Se realizaron experimentos de optimización realizados con ADN plasmídico que expresa GFP.

La Figura 20 representa la eficacia de transfección de la línea celular CHOK1 usando el protocolo descrito en la divulgación. La eficacia de transfección se determinó usando una construcción de plásmido que expresa proteína verde fluorescente. El número de células verdes observadas tras la transfección en comparación con el número total de células viables determina la eficacia de transfección del protocolo establecido. El panel A representa la imagen en campo claro y el panel B representa el mismo campo del microscopio para el canal de fluorescencia rojo.

La eficacia de la transfección se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia de la transfección} = (\text{Número de células que expresan GFP} / \text{Número total de células}) * 100$$

La eficacia de transfección transitoria optimizada es del 40-50 % en células CHOK1.

### Transfección:

Las células CHOK1 se inocularon a más del 90 % de viabilidad y a una densidad de 0,25 x 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos y se permitió que se adhiriesen durante 24 horas. Se usaron las construcciones de CRISPR pD1401 (ARNg 514-553), pD1401 (ARNg 167-207), pD1301 (ARNg 404), la combinación de pD1401 (ARNg 167-207) + pD1301 (ARNg 404) para la transfección usando Lipofectamina LTX con reactivo PlusTM. Se usaron 2,5 µg de la construcción con una proporción de ADN frente a reactivo de transfección de 1:3. Se incubaron las células durante 20-24 horas tras la transfección. Antes de la transfección, se estimó la cantidad y la calidad de ADN por espectrofotometría de UV. Un ADN de valor A<sub>260/280</sub> representa calidad y contaminación de proteína. La proporción de absorbancia a 260nm y 280 nm se usa para evaluar la pureza del ADN. Generalmente, se acepta un A<sub>260/280</sub> >1,8 como ADN "puro" o de buena calidad. Se colocaron 3-4 µl de muestra de ADN en la microcubeta y se estimó la concentración de ADN usando el Biofotómetro de Eppendorf D30 frente a un blanco adecuado.

**Tabla 8 - Dilución de ADN de CRISPR:**

Para n pocillos	2,5 µg * n
pD1401 (ARNg 514-553) o pD1401 (ARNg 167-207) o pD1301 (ARNg 404) o pD1401 (ARNg 167-207) + pD1301 (ARNg 404)	2,5 µg * n
Reactivo Plus TM	1,33*2 µl
Medio sin suero	Hasta 1ml*n

Dilución de Lipofectamina LTX:

Lipofectamina LTX	15 µl*n
Medio sin suero	Hasta 0,5 ml*n

A las células se les proporcionó un cambio del medio con medio sin suero, 1 hora antes de la transfección. Las

construcciones de CRISPR y la solución de Lipofectamina LTX se diluyeron, se mezclaron suavemente y se incubaron durante 5-10 minutos a 20-25 °C. Las diluciones de ADN y de reactivo de transfección (3 ml) se mezclan y se incuban durante 20-30 minutos a temperatura ambiente durante la formación del complejo. Se aspiró el medio de los pocillos. Se añaden gota a gota 1,5 ml de complejo de ADN y reactivo de transfección a las células colocadas en placa.

Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %. El medio completo se añadió a 1,5 ml/pocillo y se incubó durante 20-24 horas a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 20-24 horas de transfección, se tripsinizan las células y se prepara una dilución única de células.

La dilución única de células se obtiene mediante dilución de las células a una concentración de 0,5 células/100 µl. Se hizo un recuento de células usando el hemocitómetro. Se permitió que las células crecieran durante unos pocos días a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se hizo el barrido de la placa para identificar colonias de células únicas en microscopio de contraste de fase inversa. Las células que crecieron en colonias individuales distintivamente pequeñas se marcaron para una amplificación posterior. Después de 2-3 semanas, los clones de células individuales se amplificaron de un pocillo de la placa de 96 pocillos a un pocillo de la placa de 6 pocillos por tripsinización. Se permitió que crecieran las células durante 2-3 días a 37 °C al 5 % de CO<sub>2</sub> en un incubador de CO<sub>2</sub>. Las células se amplifican posteriormente de un pocillo a dos pocillos en una placa de 24 pocillos (colocación de la réplica) para el cribado adicional.

#### **Ensayo de unión a LCA-FITC (Aglutinina de *Lens culinaris* - isotiocianato de fluoresceína)**

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un fluorocromo conjugado con LCA. Por lo tanto, la presencia de proteínas fucosiladas sobre la membrana celular de las células CHOK1 de control se reconoce mediante LCA conjugada con fluoresceína. Estas células fluorescen con más brillo en el canal del citómetro de flujo específico. La fluorescencia observada se representa como unidad de fluorescencia. En las células en las que la vía de la fucosa está alterada, las líneas de inactivación no son capaces de producir proteínas celulares fucosiladas y, por lo tanto, las proteínas de la membrana celular no están fucosiladas. El ensayo de estas células con el conjugado fluoresceína-LCA da como resultado una fluorescencia comparable con el fondo. Por lo tanto, las células de inactivación de fucosa fluorescen a un nivel mucho más bajo (menos de 100 UFR) en comparación con la línea celular CHOK1 de control.

Las células se tripsinizaron, se transfirieron a un tubo de microfuga y se agitaron vorticialmente a 1500 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos usando la centrifugadora de Eppendorf Minispin. Se retiró el medio y se añadió medio nuevo a los tubos. Tanto las células CHOK1 transfectadas como las no transfectadas se procesaron de manera simultánea. Se ensayaron las células en análisis basado en citometría de flujo de LCA-FITC usando el citómetro de flujo de mesa de trabajo "Millipore GUAVA 8HT easyCyte".

Se seleccionaron 54 clones de la transfección con pD1401 (ARNg 514-553) con perfil de inactivación de fucosa. De manera similar, se seleccionaron 200 clones de la transfección con pD1401 (ARNg 167-207) o pD1301 (ARNg 404) o una combinación de pD1401 (ARNg 167-207) + pD1301 (ARNg 404) con perfil de inactivación de fucosa.

Se diluyeron 5 mg/ml de la solución madre de aglutinina de *Lens culinaris*-Fluoresceína (LCA-FITC) para obtener una concentración final de 2 µg/ml en tampón de ensayo (DPBS que contiene BSA al 2 %). Se agitaron vorticialmente las células a 1500 rpm durante 5 minutos usando la centrifuga minispin de Eppendorf. Se aspiró el medio y se resuspendió el sedimento en 0,25-1 ml de tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de LCA-FITC. Se resuspendieron las células CHOK1 de control en 0,25-1 ml de tampón de ensayo solo (control sin tinción) y 0,25-1 ml de tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de LCA-FITC (control con tinción). Todas las muestras se diluyeron para obtener 0,1-0,2 x10<sup>6</sup> células/ml en tampón de ensayo final. Después se incubaron las muestras en la oscuridad y sobre hielo durante 30 minutos. Después, 200 µl de cada muestra se dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos. La placa se cargó después en el citómetro de flujo de mesa de trabajo Millipore GUAVA easyCyte 8HT para la adquisición y el análisis de datos. El análisis de datos se hizo usando el programa informático Incyte. En algunos experimentos se usó el citómetro de flujo Accuri C6 para la adquisición y el análisis de datos.

También se realizó una tinción negativa de estreptavidina-fluoresceína (Strep-FITC). Se diluyeron 5 mg/ml de la solución madre de aglutinina de *Lens culinaris*-Fluoresceína (LCA-FITC) para obtener una concentración final de 2 µg/ml en tampón de ensayo (DPBS que contiene BSA al 2 %). Se diluyeron 1 mg/ml de la solución madre de estreptavidina-fluoresceína (Strep-FITC) para obtener una concentración final de 2 µg/ml en tampón de ensayo (DPBS que contiene BSA al 2 %). Se tomaron suspensiones celulares por duplicado y se agitaron vorticialmente las células a 1500 rpm durante 5 minutos usando la centrifuga minispin de Eppendorf. Se aspiró el medio y, en un tubo, se resuspendió el sedimento en tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de LCA-FITC y la muestra duplicada en tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de Strep-FITC. Las células CHOK1 de control se resuspendieron en tampón de ensayo solo (control sin tinción), en tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de LCA-FITC (control con tinción) y tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de Strep-FITC.

Todas las muestras se diluyeron para obtener 0,1-0,2 x 10<sup>6</sup> células/ml en 0,25-1 ml de tampón de ensayo. Después se incubaron las muestras en la oscuridad y sobre hielo durante 30 minutos. Después, 200 µl de cada muestra se

dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos. La placa se cargó en el citómetro de flujo de mesa de trabajo Millipore GUAVA easyCyte 8HT para la adquisición y el análisis de datos. El análisis de datos se hizo usando el programa informático Incyte. En algunos experimentos se usó el citómetro de flujo Accuri C6 para la adquisición y el análisis de datos.

- 5 Las células CHOK1 se transfectaron con la construcción pD1401 (ARNg 514-553) que direcciona al locus Fut8 y los resultados se proporcionan a continuación.

**Tabla 9**

Sl. N.º	ID de Muestra	UFR media
1	Control sin tinción	6,668
2	Control con tinción	968,184
3	CR1KOT1 n.º 3	684,544
4	CR1KOT1 n.º 4	680,126
5	CR1KOT1 n.º 6	16,211
6	CR1KOT1 n.º 7	134,668
7	CR1KOT1 n.º 13	594,511
8	CR1KOT1 n.º 15	635,291
9	CR1KOT1 n.º 18	26,249
10	CR1KOT1 n.º 19	430,674
11	CR1KOT1 n.º 21	244,798
12	CR1KOT1 n.º 22	18,021
13	CR1KOT1 n.º 23	11,880
14	CR1KOT1 n.º 24	341,785
15	CR1KOT1 n.º 25	523,925
16	CR1KOT1 n.º 26	10,434
17	CR1KOT1 n.º 27	539,167
18	CR1KOT1 n.º 28	515,236
19	CR1KOT1 n.º 29	589,063
20	CR1KOT1 n.º 30	682,042
21	CR1KOT1 n.º 31	13,682
22	CR1KOT1 n.º 32	711,406
23	CR1KOT1 n.º 33	935,327
24	CR1KOT1 n.º 34	14,318
25	CR1KOT1 n.º 35	641,110
26	CR1KOT1 n.º 36	13,161
27	CR1KOT1 n.º 37	16,703
28	CR1KOT1 n.º 38	583,947

- 10 La UFR se refiere al valor medio de unidades de fluorescencia relativa.

#### Resultados -

- 15 Los resultados gráficos y el perfil de fluorescencia se proporcionan en la tabla anterior y también se representa en la figura 7A y en la figura 8A de la presente divulgación. Las figuras representan el resultado gráfico y el perfil de fluorescencia observado para las líneas celulares de CHOK1 CR1KOT1 n.º 6, CR1KOT1 n.º 18, CR1KOT1 n.º 22, CR1KOT1 n.º 23, CR1KOT1 n.º 26, CR1KOT1 n.º 31, CR1KOT1 n.º 34, CR1KOT1 n.º 37, en el ensayo de unión a LCA-FITC basado en citometría de flujo. Este ensayo de citometría de flujo detecta las proteínas fucosiladas sobre la superficie celular. Por lo tanto, las células CHOK1 de control fluorescen altamente, ya que muchas proteínas fucosiladas están presentes en la línea celular CHOK1 de control. En casos en los que el complejo CRISPR/Cas es capaz de alterar el gen FUT8 en líneas celulares transfectadas, la fluorescencia de LCA-FITC se minimiza, ya que no hay proteína fucosilada en la superficie de estas líneas celulares. La figura revela la pérdida significativa de fluorescencia cuando las CR1KOT1 n.º 6, CR1KOT1 n.º 18, CR1KOT1 n.º 22, CR1KOT1 n.º 23, CR1KOT1 n.º 26, CR1KOT1 n.º 31, CR1KOT1 n.º 34 y CR1KOT1 n.º 37, se prueban en este ensayo, lo que indica que estas líneas celulares son líneas de CHOK1 con inactivación de FUT8.

Las células CHOK1 se transfectaron con las construcciones pD1401 (ARNg 167-207), pD1301 (ARNg 404), pD1401

(ARNg 167-207)+ pD1301 (ARNg 404) que direccionan al locus GMD y los resultados se proporcionan en la tabla a continuación.

Tabla 10

5

ID de Muestra	Construcción CRISPR usada	UFR media	
		LCA-FITC	Strep-FITC
CHOK1	---	405.109,00	8.024,50
C1GMD1.12	pD1401 (ARNg 167-207)	20.447,50	3.806,00
C1GMD1.27	pD1401 (ARNg 167-207)	18.749,00	3.672,00
C1GMD2.30	pD1301 (ARNg 404)	18.124,00	4.065,50
C1GMD2.34	pD1301 (ARNg 404)	349.435,00	4.071,00
C1GMD3.4	pD1401 (ARNg 167-207)+ pD1301 (ARNg 404)	23.583,00	5.833,00
C1GMD3.36	pD1401 (ARNg 167-207)+ pD1301 (ARNg 404)	78.197,00	3.643,00
C1GMD3.43	pD1401 (ARNg 167-207)+ pD1301 (ARNg 404)	37.593,00	8.240,00
C1GMD3.49	pD1401 (ARNg 167-207)+ pD1301 (ARNg 404)	20.797,50	4.525,50
C1GMD3.51	pD1401 (ARNg 167-207)+ pD1301 (ARNg 404)	23.722,00	4.945,00

Los resultados gráficos y el perfil de fluorescencia se proporcionan en la tabla anterior y también se representa en las figuras 7B y 8B de la presente divulgación. Las figuras representan el resultado gráfico y el perfil de fluorescencia observado para las CHOK1, C1GMD1.12, C1GMD1.27, C1GMD2.30, C1GMD2.34, C1GMD3.4, C1GMD3.36, C1GMD3.43, C1GMD3.49, C1GMD3.51 en el ensayo de unión a LCA-FITC basado en citometría de flujo. Este ensayo de citometría de flujo detecta las proteínas fucosiladas sobre la superficie celular. Por lo tanto, las células CHOK1 de control fluorescen altamente, ya que muchas proteínas fucosiladas están presentes en la línea celular CHOK1 de control. En casos en los que el complejo CRISPR/Cas es capaz de alterar el gen GMD en líneas celulares transfectadas, la fluorescencia de LCA-FITC se minimiza, ya que no hay proteína fucosilada en la superficie de estas líneas celulares. La figura revela la pérdida significativa de fluorescencia cuando las C1GMD1.12, C1GMD1.27, C1GMD2.30, C1GMD3.4, C1GMD3.36, C1GMD3.43, C1GMD3.49, C1GMD3.51 se probaron en este ensayo, lo que indica que estas líneas celulares son posibles líneas celulares CHOK1 de inactivación de GMD.

También se probó otro conjunto de transfección con el ensayo de fluorescencia de LCA-FITC. Los datos de la citometría de flujo se proporcionan en la tabla a continuación.

Tabla 11

ID de Muestra	Construcción CRISPR usada	UFR media	
		LCA-FITC	Strep-FITC
CHOK1	----	313.999,50	4.952,50
CR1KOT1	pD1401 (ARNg 167-207)	17.976,00	5.169,00
C1GMD1.37	pD1401 (ARNg 167-207)	21.508,00	4.331,00
C1GMD1.4	pD1401 (ARNg 167-207)	22.506,00	5.019,00
C1GMD1.41	pD1401 (ARNg 167-207)	23.326,50	4.961,00
C1GMD1.43	pD1401 (ARNg 167-207)	22.446,50	4.695,00
C1GMD1.44	pD1401 (ARNg 167-207)	24.080,50	5.506,00

Los resultados gráficos y el perfil de fluorescencia se proporcionan en la tabla anterior y también se representa en las figuras 7C y 8C de la presente divulgación. Las figuras representan el resultado gráfico y el perfil de fluorescencia observado para las CHOK1, C1GMD1.37, C1GMD1.4, C1GMD1.41, C1GMD1.43, y C1GMD1.44, en el ensayo de unión a LCA-FITC basado en citometría de flujo. Este ensayo de citometría de flujo detecta las proteínas fucosiladas sobre la superficie celular. Por lo tanto, las células CHOK1 de control fluorescen altamente, ya que muchas proteínas fucosiladas están presentes en la línea celular CHOK1 de control. En casos en los que el complejo CRISPR/Cas es capaz de alterar el gen GMD en líneas celulares transfectadas, la fluorescencia de LCA-FITC se minimiza, ya que no hay proteína fucosilada en la superficie de estas líneas celulares. La figura revela la pérdida significativa de fluorescencia cuando las C1GMD1.37, C1GMD1.4, C1GMD1.41, C1GMD1.43, C1GMD1.44 se probaron en este ensayo, lo que indica que estas líneas celulares son posibles líneas celulares CHOK1 de inactivación de GMD.

### 35 Ensayo de selección de LCA (aglutinina de Lens culinaris)

Se separaron múltiples poblaciones de líneas celulares clonales unicelulares en placas de réplica tras la transfección con el complejo CRISPR/Cas. Estas líneas celulares se probaron después con 200 µg de reactivo LCA en el medio

de cultivo. Se observaron las células cada día para conformar la salud y la morfología de las células y se tomaron fotografías en los puntos temporales apropiados. La Figura 5 indica las fotografías tomadas después de un día de cultivo tras el punto de partida de selección por LCA y la figura 6 indica las fotografías tomadas después de 4 días de cultivo. Las líneas celulares indicadas en este caso muestran resistencia frente a LCA representadas por células resistentes en el día uno que se han multiplicado y cultivado en grandes colonias de células tras el día 4 de cultivo en presencia de reactivo LCA. Se observó la morfología celular con microscopio y las observaciones se registraron en los días 1 y 4.

Las células se observaron regularmente con el microscopio de contraste de fase inversa y se controló la morfología de la colonia. Las fotografías tomadas en diferentes puntos temporales del ensayo de selección por LCA con 200 µg/ml de LCA claramente muestran que las células CHOK1 de control están completamente muertas en el día 4 de cultivo, mientras que los clones seleccionados muestran un crecimiento celular continuo y morfología celular sana incluso después de 4 días de cultivo.

De estas figuras se observa que los siguientes clones - CR1KOT1 n.º 44, CR1KOT1 n.º 52, CR1KOT1 n.º 55, CR1KOT1 n.º 61 y CR1KOT1 n.º 67, conservan la morfología de la colonia incluso después del tratamiento con 200 µg/ml de LCA. Por lo tanto, se considera que estos clones son posibles fenotipos de desactivación de FUT 8.

Durante la selección por LCA de clones transfectados con pD1401 (ARNg 167-207), se comparó la viabilidad de los clones en el día 1, el día 4 y el día 6, en la figura 6B de la presente divulgación. De estas figuras se observa que los siguientes clones C1GMD1.12, C1GMD1.27, C1GMD1.40, C1GMD1.41, C1GMD1.43 y C1GMD1.44 conservan la morfología de la colonia incluso después del tratamiento con 200 µg/ml de LCA. Por lo tanto, se considera que estos clones son posibles fenotipos de desactivación de FUT 8. Las líneas celulares indicadas en este caso muestran resistencia frente a LCA en el día uno que se han multiplicado y cultivado en grandes colonias de células tras el día 4 y el día 6 de cultivo en presencia de reactivo LCA. Se observó la morfología celular con microscopio y las observaciones se registraron en los días 1, 4 y 6. Las células se observaron regularmente con el microscopio de contraste de fase inversa y se controló la morfología de la colonia. Las fotografías tomadas en diferentes puntos temporales del ensayo de selección por LCA con 200 µg/ml de LCA claramente muestran que las células CHOK1 de control están completamente muertas en el día 4 de cultivo, mientras que los clones seleccionados muestran un crecimiento celular continuo y morfología celular sana incluso después de 4 días de cultivo.

#### **Ensayo de unión de LCA-FITC:**

Para el segundo conjunto de ensayo de unión de LCA-FITC, los siguientes clones han demostrado un perfil de citometría de flujo de inactivación de fucosa: CR1KOT1 n.º 44, CR1KOT1 n.º 46, CR1KOT1 n.º 48, CR1KOT1 n.º 49, CR1KOT1 n.º 51, CR1KOT1 n.º 52, CR1KOT1 n.º 55, CR1KOT1 n.º 59, CR1KOT1 n.º 61, CR1KOT1 n.º 66, CR1KOT1 n.º 67 (Figura 10). Se diluyeron 5 mg/ml de la solución madre de aglutinina de Lens culinaris-Fluoresceína (LCA-FITC) para obtener una concentración final de 2 µg/ml en tampón de ensayo (DPBS que contiene BSA al 2 %). Se agitaron vorticialmente las células a 1500 rpm durante 5 minutos usando la centrifuga minispin de Eppendorf. Se aspiró el medio y se resuspendió el sedimento en 0,25-1 ml de tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de LCA-FITC.

Se resuspendieron las células CHOK1 de control en 0,25-1 ml de tampón de ensayo solo (control sin tinción) y 0,25-1 ml de tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de LCA-FITC (control con tinción). Todas las muestras se diluyeron para obtener  $0,1-0,2 \times 10^6$  células/ml en tampón de ensayo final. Después se incubaron las muestras en la oscuridad y sobre hielo durante 30 minutos. Después, 200 µl de cada muestra se dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos. La placa se cargó después en el citómetro de flujo de mesa de trabajo Millipore GUAVA easyCyte 8HT para la adquisición y el análisis de datos. El análisis de datos se hizo usando el programa informático Incyte.

**Tabla 12**

SI. N.º	ID de Muestra	UFR media
1	Control sin tinción	9,604
2	Control con tinción	869,216
3	CR1KOT1 n.º 40	1003,328
4	CR1KOT1 n.º 41	937,068
5	CR1KOT1 n.º 42	662,994
6	CR1KOT1 n.º 44	23,044
7	CR1KOT1 n.º 45	1111,122
8	CR1KOT1 n.º 46	39,878
9	CR1KOT1 n.º 47	920,470
10	CR1KOT1 n.º 48	20,646
11	CR1KOT1 n.º 49	20,338
12	CR1KOT1 n.º 50	947,668

13	CR1KOT1 n.º 51	19,404
14	CR1KOT1 n.º 52	19,210
15	CR1KOT1 n.º 53	1287,536
16	CR1KOT1 n.º 54	858,085
17	CR1KOT1 n.º 55	20,608
18	CR1KOT1 n.º 56	1083,210
19	CR1KOT1 n.º 57	887,343
20	CR1KOT1 n.º 58	944,689
21	CR1KOT1 n.º 59	17,307
22	CR1KOT1 n.º 60	1057,409
23	CR1KOT1 n.º 61	14,960
24	CR1KOT1 n.º 62	1102,714
25	CR1KOT1 n.º 63	974,268
26	CR1KOT1 n.º 64	1464,378
27	CR1KOT1 n.º 65	924,585
28	CR1KOT1 n.º 66	17,355
29	CR1KOT1 n.º 67	20,936

Los resultados proporcionados en la tabla anterior también se representan en la representación gráfica en la figura 10 y el perfil de fluorescencia en la figura 11 de la presente divulgación.

5 La Figura 10 representa el resultado gráfico observado para las líneas celulares de CHOK1 CR1KOT1 n.º 44, CR1KOT1 n.º 46, CR1KOT1 n.º 48, CR1KOT1 n.º 49, CR1KOT1 n.º 51, CR1KOT1 n.º 52, CR1KOT1 n.º 55, CR1KOT1 n.º 59, CR1KOT1 n.º 61, CR1KOT1 n.º 66, CR1KOT1 n.º 67 en el ensayo de unión a LCA-FITC basado en citometría de flujo. La Figura 11 representa los perfiles de fluorescencia representativos observados en las líneas celulares CR1KOT1 n.º 44, CR1KOT1 n.º 49, CR1KOT1 n.º 51, CR1KOT1 n.º 52, CR1KOT1 n.º 55, CR1KOT1 n.º 59, CR1KOT1 n.º 61, CR1KOT1 n.º 67. Todos los clones se traspasaron durante los días adicionales antes de ser analizados en el presente experimento. Este ensayo de citometría de flujo detecta las proteínas fucosiladas sobre la superficie celular. Por lo tanto, las células CHOK1 de control fluorescen altamente, ya que muchas proteínas fucosiladas están presentes en la línea celular CHOK1 de control. En casos en los que el complejo CRISPR/Cas es capaz de alterar el gen FUT8 en líneas celulares transfectadas, la fluorescencia de LCA-FITC se minimiza, ya que no hay proteína fucosilada en la superficie de estas líneas celulares. La figura revela la pérdida significativa de fluorescencia cuando las CR1KOT1 n.º 44, CR1KOT1 n.º 46, CR1KOT1 n.º 48, CR1KOT1 n.º 49, CR1KOT1 n.º 51, CR1KOT1 n.º 52, CR1KOT1 n.º 55, CR1KOT1 n.º 59, CR1KOT1 n.º 61, CR1KOT1 n.º 66, CR1KOT1 n.º 67 se probaron en este ensayo, lo que indica que estas líneas celulares son líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8.

20 Conclusión - se han identificado 17 posibles candidatos para la línea celular CHOK1 de inactivación de fut8. Estos 17 clones son como sigue:

25 CR1KOT1 n.º 006, CR1KOT1 n.º 018, CR1KOT1 n.º 022, CR1KOT1 n.º 023, CR1KOT1 n.º 026, CR1KOT1 n.º 031, CR1KOT1 n.º 034, CR1KOT1 n.º 036, CR1KOT1 n.º 037, CR1KOT1 n.º 044, CR1KOT1 n.º 049, CR1KOT1 n.º 051, CR1KOT1 n.º 052, CR1KOT1 n.º 055, CR1KOT1 n.º 059, CR1KOT1 n.º 061 y CR1KOT1 n.º 067.

Se han identificado 13 posibles candidatos para la línea celular CHOK1 de inactivación GMD. Los clones son los siguientes:

30 C1GMD1.12, C1GMD1.27, C1GMD1.37, C1GMD1.4, C1GMD1.41, C1GMD1.43, C1GMD1.44, C1GMD2.30, C1GMD3.4, C1GMD3.36, C1GMD3.43, C1GMD3.49, C1GMD3.51

### Ejemplo 3: ENSAYO DE UNIÓN A LCA-FITC

35 Las líneas celulares clonales CHOK1 de inactivación de fucosa se probaron en experimentos de repetición independientes usando el ensayo de unión LCA-FITC:

Se probaron las siguientes líneas celulares clonales para la repetibilidad del ensayo de unión a LCA-FITC. CR1KOT1 n.º 006, CR1KOT1 n.º 018, CR1KOT1 n.º 022, CR1KOT1 n.º 023, CR1KOT1 n.º 026, CR1KOT1 n.º 031, CR1KOT1 n.º 034, CR1KOT1 n.º 036, CR1KOT1 n.º 037, CR1KOT1 n.º 044, CR1KOT1 n.º 049, CR1KOT1 n.º 051, CR1KOT1 n.º 052, CR1KOT1 n.º 055, CR1KOT1 n.º 059, CR1KOT1 n.º 061 y CR1KOT1 n.º 067.

40 Se diluyeron 5 mg/ml de la solución madre de aglutinina de Lens culinaris-Fluoresceína (LCA-FITC) para obtener una concentración final de 2 µg/ml en tampón de ensayo (DPBS que contiene BSA al 2 %). Se agitaron vorticialmente las células a 1500 rpm durante 5 minutos usando la centrífuga minispin de Eppendorf. Se aspiró el

medio y se resuspendió el sedimento en 0,25-1 ml de tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de LCA-FITC. Se resuspendieron las células CHOK1 de control en 0,25-1 ml de tampón de ensayo solo (control sin tinción) y 0,25-1 ml de tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de LCA-FITC (control con tinción). Todas las muestras se diluyeron para obtener 0,1-0,2 x 10<sup>6</sup> células/ml en tampón de ensayo final. Después se incubaron las muestras en la oscuridad y sobre hielo durante 30 minutos. Después, 200 µl de cada muestra se dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos. La placa se cargó después en el citómetro de flujo de mesa de trabajo Millipore GUAVA easyCyte 8HT para la adquisición y el análisis de datos. El análisis de datos se hizo usando el programa informático Incyte.

Resultados:

La siguiente tabla describe los datos de repetibilidad del ensayo de unión de LCA-FITC para todos los clones seleccionados.

Tabla 13

Sl. N.º	ID de Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	EEM
1	Control sin tinción	6,668	8,771	12,189	9,209	1,61
2	Control con tinción	968,184	984,168	982,260	978,204	5,04
3	CR1KOT1 n.º 006	16,211	19,475	28,399	21,362	3,64
4	CR1KOT1 n.º 018	26,249	33,250	59,006	39,501	9,96
5	CR1KOT1 n.º 022	18,021	17,410	25,411	20,281	2,57
6	CR1KOT1 n.º 023	11,880	17,120	13,775	14,258	1,53
7	CR1KOT1 n.º 026	10,434	17,491	24,953	17,626	4,19
8	CR1KOT1 n.º 031	13,682	18,932	34,881	22,498	6,37
9	CR1KOT1 n.º 034	14,318	10,896	19,826	15,013	2,60
10	CR1KOT1 n.º 036	13,161	19,505	29,793	20,820	4,85
11	CR1KOT1 n.º 037	16,703	16,601	29,906	21,070	4,42
12	CR1KOT1 n.º 044	23,044	24,937	32,886	26,956	3,01
13	CR1KOT1 n.º 049	20,338	17,215	26,426	21,327	2,70
14	CR1KOT1 n.º 051	19,404	18,555	26,543	21,501	2,53
15	CR1KOT1 n.º 052	19,210	15,024	31,349	21,861	4,90
16	CR1KOT1 n.º 055	20,608	19,368	27,686	22,554	2,59
17	CR1KOT1 n.º 059	17,307	21,119	27,764	22,063	3,06
18	CR1KOT1 n.º 061	14,960	23,307	35,791	24,686	6,05
19	CR1KOT1 n.º 067	20,936	18,053	27,323	22,104	2,74

La representación gráfica del ensayo de unión a LCA-FITC se presenta en la figura 12. El análisis de los datos sugiere una alta reproducibilidad del patrón de unión a LCA-FITC para las líneas celulares clonales CHOK1 de inactivación de fucosa. Estas líneas celulares CHOK1 de inactivación de fucosa se prueban adicionalmente para las características del cultivo y se compararon con la línea celular CHOK1 parental no transfectada.

**Ejemplo 4: ENSAYO DE ESTREPTAVIDINA-FITC**

Las líneas celulares clonales CHOK1 de inactivación de fucosa se probaron con el conjugado de estreptavidina-FITC para asegurar la interacción específica de la unión a LCA-FITC:

La tinción de estreptavidina conjugada con FITC (Strep-FITC) de los clones se llevó a cabo para asegurar que no hay unión no específica del colorante FITC. Las proteínas de la membrana celular no se unen al conjugado de estreptavidina-FITC, mientras que las proteínas de membrana fucosilada se unen de forma específica al conjugado LCA-FITC. Las células CHOK1 de control se tiñeron tanto con LCA-FITC como con Strep-FITC en reacciones separadas para confirmar esta especificidad. Todos los clones se tiñeron de forma similar con conjugados de estreptavidina-FITC y LCA-FITC para determinar la unión no específica.

La Figura 14 de la presente divulgación representa el ensayo de citometría de flujo de LCA, y la comparación de los clones a través del ensayo de LCA-FITC y Strep-FITC, respectivamente. Para los siguientes clones se observó el fenotipo de inactivación de fucosa: CR1KOT1 n.º 006, CR1KOT1 n.º 018, CR1KOT1 n.º 022, CR1KOT1 n.º 023, CR1KOT1 n.º 026, CR1KOT1 n.º 031, CR1KOT1 n.º 034, CR1KOT1 n.º 036, CR1KOT1 n.º 037, CR1KOT1 n.º 044, CR1KOT1 n.º 049, CR1KOT1 n.º 051, CR1KOT1 n.º 052, CR1KOT1 n.º 055, CR1KOT1 n.º 059, CR1KOT1 n.º 061 y CR1KOT1 n.º 067. En todos los clones, se observó una reducción significativa de la fluorescencia en comparación con el control y, por lo tanto, esto demuestra la ausencia de proteína fucosilada en la superficie celular para los clones. Estos datos proporcionan la evidencia funcional de que estas líneas funcionales carecen de la proteína fucosilada debido a la alteración del gen FUT8 llevada a cabo usando el complejo en el método de la presente

divulgación.

Se diluyeron 1 mg/ml de la solución madre de estreptavidina-fluoresceína (Strep-FITC) para obtener una concentración final de 2 µg/ml en tampón de ensayo (DPBS que contiene BSA al 2 %). Se agitaron vorticialmente las células a 1500 rpm durante 5 minutos usando la centrífuga minispin de Eppendorf. Se aspiró el medio y se resuspendió el sedimento en 0,25-1 ml de tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de Estreptavidina-FITC. Se resuspendieron las células CHOK1 de control en 0,25-1 ml de tampón de ensayo solo (control sin tinción) y 0,25-1 ml de tampón de ensayo que contiene 2 µg/ml de Estreptavidina-FITC (control con tinción). Todas las muestras se diluyeron para obtener 0,1-0,2 x 10<sup>6</sup> células/ml en tampón de ensayo final. Después se incubaron las muestras en la oscuridad y sobre hielo durante 30 minutos.

Después, 200 µl de cada muestra se dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos. La placa se cargó después en el citómetro de flujo de mesa de trabajo Millipore GUAVA easyCyte 8HT para la adquisición y el análisis de datos. El análisis de datos se hizo usando el programa informático Incyte.

Se llevó a cabo a comparación con Estreptavidina-FITC para asegurar la interacción específica del conjugado LCA-FITC. Los datos sugieren solo fluorescencia de fondo observada con el conjugado Estreptavidina-FITC cuando se probó con la línea celular de control CHOK1 y cualquiera de las líneas celulares transfectadas con CRISPR/Cas.

La Figura 14 representa la especificidad del ensayo de citometría de flujo de LCA-FITC, desarrollado para cribar las líneas celulares CHOK1 de inactivación de fucosa. Los experimentos de citometría de flujo se llevaron a cabo con el conjugado de Estreptavidina-FITC. La Estreptavidina-FITC no reconoce proteínas de superficie celular en la línea celular de CHOK1 de control, lo que indica la interacción específica del conjugado LCA-FITC. Adicionalmente, el conjugado de estreptavidina-FITC revela niveles similares de fluorescencia de fondo entre líneas celulares positivas y negativas identificadas por el conjugado LCA-FITC. La Figura 14 no muestra interacción no específica del conjugado de LCA-FITC usado en este estudio cuando se comparó con el conjugado de Estreptavidina-FITC.

**Determinación de la curva de crecimiento para las líneas celulares CHOK1 de inactivación de fucosa:**

La determinación de la curva de crecimiento de los clones seleccionados se realizó para asegurar que el perfil de crecimiento no se altera significativamente en comparación con las células CHOK1 de tipo silvestre durante el proceso de desarrollo de la línea celular de inactivación. Se inocularon 0,1 X 10<sup>6</sup> células CHOK1 en placas de cultivo tisular de 6 pocillos. La inoculación se hizo para 5 puntos temporales para cada clon. Para cada punto temporal, se hizo una inoculación por triplicado (por ejemplo, 15 pocillo para 5 puntos temporales). En cada punto temporal, se hicieron recuentos celulares por triplicado. El recuento de células viables se realizó usando un hemocitómetro o un analizador de viabilidad celular Vi-cell XR. Se generaron las respectivas curvas de crecimiento con EEM como barra de error. La Tabla 14 describe los datos de crecimiento representativos de una de las líneas celulares de inactivación de FUT8.

**Tabla 14**

Tiempo (h)	Recuento medio de células viables (X10 <sup>6</sup> )				
	CHOK1 de control	CR1KOT1 n.º 52	CR1KOT1 n.º 55	CR1KOT1 n.º 61	CR1KOT1 n.º 67
0	0,100	0,100	0,100	0,200	0,100
24	0,313	0,261	0,344	0,370	0,411
48	0,858	0,671	0,925	0,992	1,226
72	2,295	1,439	2,031	2,411	2,875
96	2,680	3,398	3,603	5,272	4,738

Tiempo (h)	Recuento medio de células viables (X10 <sup>6</sup> )					
	CHOK1 de control	CR1KOT1 n.º 06	CR1KOT1 n.º 18	CR1KOT1 n.º 22	CR1KOT1 n.º 23	CR1KOT1 n.º 26
0	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
24	0,313	0,270	0,217	0,167	0,183	0,243
48	0,858	0,790	0,567	0,540	0,680	0,457
96	2,680	4,357	2,477	3,857	3,867	1,997

Tiempo (h)	Recuento medio de células viables (X10 <sup>6</sup> )					
	CHOK1 de control	CR1KOT1 n.º 31	CR1KOT1 n.º 34	CR1KOT1 n.º 36	CR1KOT1 n.º 37	CR1KOT1 n.º 44
0	0,100	0,100	0,100	0,200	0,100	0,100

24	0,313	0,180	0,240	0,500	0,267	0,253
48	0,858	0,713	0,370	0,890	0,700	0,597
96	2,680	3,160	2,427	3,753	3,593	3,367

Resultados: El recuento de células viables para cada una de las líneas celulares se probó y se usó para la determinación de la curva de crecimiento. Las siguientes líneas celulares CHOK1 de inactivación de fucosa se usan para el desarrollo de la curva de crecimiento, CR1KOT1 n.º 006, CR1KOT1 n.º 018, CR1KOT1 n.º 022, CR1KOT1 n.º 023, CR1KOT1 n.º 026, CR1KOT1 n.º 031, CR1KOT1 n.º 034, CR1KOT1 n.º 036, CR1KOT1 n.º 037, CR1KOT1 n.º 044, CR1KOT1 n.º 049, CR1KOT1 n.º 051, CR1KOT1 n.º 052, CR1KOT1 n.º 055, CR1KOT1 n.º 061 y CR1KOT1 n.º 067.

Los datos se analizaron y se representaron gráficamente en la curva de crecimiento. Las curvas de crecimiento de las respectivas líneas celulares se proporcionan en las figuras 13A, 13B y 13C de la presente divulgación.

De las figuras se observa que la mayoría de las líneas celulares clonales tienen un potencial de crecimiento comparable con respecto a la línea celular parental de CHOK1. Estas líneas celulares clonales se usan para la sobreexpresión de las proteínas y/o anticuerpos monoclonales terapéuticos. Se hizo un recuento de células viables todos los días durante 5 días en condiciones de cultivo óptimas, usando el contador Vi-Cell. Unas pocas líneas celulares CHOK1 de inactivación de fucosa, CR1KOT1 n.º 018, CR1KOT1 n.º 026, CR1KOT1 n.º 034, CR1KOT1 n.º 052 y CR1KOT1 n.º 055 han demostrado tener un potencial de crecimiento ligeramente más lento en comparación con otras líneas celulares.

#### Ejemplo 5: ENSAYOS DE SECUENCIACIÓN GENÓMICA

Los clones transfectados con CRISPR seleccionados a través del ensayo funcional, es decir, se usaron ensayos de citometría de flujo con LCA-FITC para el análisis de secuencia genómica. El locus genómico de FUT8 en hámster chino está bien documentado en la bibliografía (NW 003613860) y se usa como una secuencia de tipo silvestre para comprender el tipo de modificación génica en cada clon de línea celular. De manera similar, el locus genómico de GMD de hámster chino se obtuvo de la base de datos de la secuencia, NW\_003613635.1, NP\_001233625.1, NM\_001246696.1 y se usó como secuencia de tipo silvestre para entender el tipo de modificación génica en cada línea celular. El objetivo de este ejemplo es analizar los resultados de secuenciación de ADN genómico obtenidos de las líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8 transfectadas con CRISPR/Cas y las líneas celulares CHOK1 de inactivación de GMD. Todas las líneas celulares documentadas en este caso son líneas celulares clonales y se seleccionan del ensayo de selección del medio LCA y del ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC.

En resumen, las líneas celulares clonales seleccionadas se cultivan en condiciones de cultivo apropiadas para el aislamiento de ADN genómico, el ADN genómico purificado se usó para la amplificación por PCR usando cebadores que flanquean los loci diana de FUT8 y GMD, el producto amplificado por PCR se purifica después y se clona en un vector adecuado usando células *E. coli* competentes, las colonias de *E. coli* resistentes a ampicilina resultantes se seleccionan y se cultivan, los ADN plasmídicos se aíslan de cada clon bacteriano, aproximadamente se prueban 5-10 colonias bacterianas individuales por líneas celulares clonales a través de la secuenciación automática para comprender el tipo de modificación en el locus genómico diana de FUT8.

Los siguientes reactivos y soluciones se usaron para llevar a cabo la secuenciación genómica de los clones seleccionados

Todo el protocolo de secuenciación genómica se divide en los siguientes cuatro procesos

- A. Aislamiento de ADN genómico de los clones seleccionados
- B. Estrategia de PCR para amplificar locus genómico específico para cada línea celular.
- C. Clonación de los productos de PCR en vectores de secuenciación
- D. Análisis de datos de secuencia e identificación de INDEL

#### Aislamiento de ADN genómico de los clones seleccionados

Las líneas celulares CHOK1 clonales se cultivaron en medio DMEM avanzado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina 4 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en matraces T175 a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad relativa del 75 % en incubadoras de condiciones controladas. El cultivo celular se observó cada día y se controló la viabilidad. Se recolectaron células con una confluencia del 80 % y más del 95 % de viabilidad con tripsinización. El día del aislamiento, se retiró el medio de cultivo y las células adherentes se lavaron primero con 10 ml de DPBS seguido por la adición de 4 ml de solución de tripsina-EDTA al 0,05 % para la tripsinización. Se incubaron las células a 37 °C durante 2-3 minutos y se recolectaron. Después se mezclaron las células con 10 ml de DPBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El medio gastado se retiró y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de DPBS. Las células se lavaron de nuevo usando la centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. El DPBS se retiró por completo mediante aspiración. El sedimento celular final se usó

para el aislamiento del ADN genómico.

5 El ADN genómico se aisló de las células CHOK1 de control, y las líneas celulares clonales CHOK1 transfectadas con CRISPR/Cas que presentan resistencia a LCA y se seleccionó a través del ensayo de citometría de flujo con LCA. El kit de extracción de ADNg de QIAGEN comercialmente disponible se usó para el aislamiento del ADN genómico siguiendo el protocolo del fabricante.

**Diseño de estrategia de PCR**

10 La secuencia de ADN genómico de hámster chino se analizó a partir de la secuencia de la base de datos públicamente disponible NW\_003613860. Las secuencias de ADN del exón 7 de FUT8 y la secuencia del intrón parcial se usó para diseñar la estrategia de PCR para amplificar el locus diana FUT8.

15 Las secuencias de intrón y de exón de GMD se obtuvieron de NW 003613635.1 y NM\_001246696.1 y los análisis de secuencia se llevaron a cabo para el exón 3 y el exón 4.

20 Los cebadores se diseñaron basándose en la longitud del cebador, en la longitud del producto de PCR, en el contenido de GC, en la temperatura de fusión y en el potencial de formación de homodúplex y de heterodúplex. Los cebadores se diseñaron flanqueando el locus diana de FUT8 tal como se proporciona a continuación. El producto de PCR amplificado está pensado para el análisis de mutación debido a la SSB mediada por CRISPR y la posterior reparación de ADN. La siguiente secuencia de nucleótidos representa la región de interés con secuencias del cebador en negrita.

25 El exón 7 de Fut8 y las secuencias de intrón asociadas se usaron para el diseño del cebador de PCR:

***aagaaataagctgaatcagctctgacttattgtgtgattttcaatacctgtgaccaaatagagaagttaactccttatatctttatcttattgtttctct***  
***ggaagAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAG***  
***GCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGG***  
***CACCCAGCGAACACTCATCTTGGAAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATG***  
***GGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCAC***  
***TGGACTGGTCAGgtaaggagcatgtgcacatgaaagatctctggttaggtcagattagcac***

30 Los intrones están representados desde la base 21 hasta la base 106 y desde la base 345 hasta la base 371 en minúsculas. El exón 7 se representa desde la base 107 hasta la base 344 en mayúsculas. Los sitios de unión del cebador de izquierda y derecha están subrayados.

El exón 3 y el exón 4 de GMD y las secuencias de intrón asociadas se usaron para el diseño del cebador de PCR:

Se usaron las siguientes secuencias.

35 **Exón 3 de GMD e intrones circundantes**

***gatccttcagtggtccaagtaactgggtttgcaggggtgggcagtcacacctgggaacaccagtttgaccttcatttcatatgtgaataatacat***  
***atttcagtttgatattgaaatgtttctctgttatctcatatcttgatgatcttttataaatcttaaagACATGAAGTTGCACTATGG***  
***TGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAATCATCAATGAAGTCAAACCTACAG***  
***AGATCTACAATCTTGGTGCCCAGAGCCATGTCAAGgtaagctcttctcattgccatggcttctttggctgtgc***  
***ctttgtagtgttctctattcactcacattgtgtttctcaataacaatagcaaccactagttcttatcaagtttagtcttcagattagttgggaattcat***  
***cctaataaaaactcataaatttttaaggtgaggtttctgttactcaacag***

40 Los intrones están representados desde la base 23 hasta la base 166 y desde la base 277 hasta la base 447 en minúsculas. El exón 3 se representa desde la base 167 hasta la base 276 en mayúsculas. Los sitios de unión del cebador de izquierda y derecha están subrayados.

45 **Exón 4 de GMD e intrones circundantes**

gacgtagtcttcagctattctatactggaagtagatgatattctcattggaaattctgttaggaagtaacccttctgtctcttacctgcatagaatc  
ccaggatataaaactgtgcttgcgcccttgccattgtctctcactggggcctttattgcatctcatatctgccttctcttccagATTTCCCT  
 TTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTGATGGAGTTGGCACCTTGCGGCTTCTGG  
 ATGCAATTAAGACTTGTGGCCTTATAAATTCTGTGAAGTTCTACCAGGCCTCAACTA  
 GTGAACTGTATGGAAAAGTGCAAGAAATACCCAGAAAGAGACCACCCCTTCTAT  
 CCAAGGTCGCCCTATGgtaagaattctgtgccagctgtatgtgaggctctctgcaggtgtggggattttctgcttcttctg  
cac

5 Los intrones están representados desde la base 21 hasta la base 187 y desde la base 381 hasta la base 432 en minúsculas. El exón 4 se representa desde la base 188 hasta la base 380 en mayúsculas. Los sitios de unión del cebador de izquierda y derecha están subrayados.

**Diseño del cebador para la identificación de INDEL por PCR**

10 La PCR genómica se realizó usando el kit de extracción de ADNg de QIAGEN usando los siguientes cebadores mencionados en la tabla 15.

**Tabla 15**

Conjuntos de PCR	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')	Tamaño del producto de PCR	Base	T <sub>f</sub>	% de GC
Cebadores de CRISPR en el exón 7 de FUT8	CRP_P1_Fw	AAGAAATAAGCTGAATCA GCTCTGAC – SEQ ID No. 94	394 pb	26	55,2	38
	CRP_P1_Rv	GTGCTAATCTGACCTAACC AGAG – SEQ ID No. 95		23	54,7	47,8
Cebadores de CRISPR en el exón 3 de GMD	GMD_P01_Fw	GATCCTTCAGTGTTCCAAG TAC -SEQ ID No. 96	468 pb	22	53	45,5
	GMD_P01_Rv	CTGTTGAGTAACAGAAAC CTC -SEQ ID No. 97		21	50,8	42,9
Cebadores de CRISPR en el exón 4 de GMD	GMD_P03_Fw	GACGTAGTCTTCAGCTATT C - SEQ ID No. 98	453 pb	20	49,9	45
	GMD_P03_Rv	GTGCAGAAAGAAAGCAGA AAC - SEQ ID No. 99		21	52,6	42,9

15 La siguiente sección proporciona detalles experimentales para la generación de producto de PCR a partir de ADN genómico de CHOK1 de líneas celulares de control y líneas celulares clonales seleccionadas de LCA, la clonación de productos de PCR en células competentes de *E. coli* y secuenciación de productos de PCR clonados.

**Optimización de las condiciones de PCR -**

20 Se diseñaron los experimentos para estandarizar las condiciones de PCR. Los parámetros probados incluyeron, la concentración de ADN genómico (de 100 ng a 1000 ng), las concentraciones del cebador (2 nmol a 20 nmol), la temperatura de hibridación de PCR (de 55,8 °C a 62,9 °C) y el tiempo (20 segundos a 50 segundos), el tiempo de extensión del producto de PCR (de 30 seg a 60 seg) y el número de ciclos de PCR se establece a 30 ciclos. La condición optimizada de llegada se describe en la siguiente sección.

25 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando la prueba de lectura de la polimerasa Phusion para asegurar que las mutaciones mediadas por PCR están limitadas. Tras los ciclos de amplificación por PCR, se añade la enzima Taq polimerasa en la mezcla para la adición de ADN por cola homopolimérica. La etapa de adición de ADN por cola

homopolimérica es importante, ya que las bases extra añadidas a los productos de PCR permiten la clonación directa en el vector de secuenciación descrito en la siguiente sección. Con el fin de añadir proyecciones de dATP al producto de PCR para el vector de clonación en TA, el producto amplificado de la polimerasa Phusion se incubó con la ADN polimerasa Taq durante 20 minutos a 72 °C.

5 **Comprobación cruzada de la muestra de ADN genómico mediante PCR-**

Los productos de PCR de ADN genómico se analizaron en electroforesis en gel de agarosa y la longitud del producto se confirmó usando un patrón de peso molecular. Las muestras de PCR con un perfil de amplificación claro se usaron en la próxima etapa de procesamiento.

10

**Elución de gel de producto de PCR usando el kit QIAGEN-**

Los productos de PCR amplificados se cargaron en gel de agarosa al 1 % de preparación reciente y se sometieron a electroforesis a 100 V durante una hora para separar los productos de PCR amplificados de los cebadores no usados y cualquier otro dímero producido durante el proceso de amplificación. Los productos amplificados se escindieron del gel y se eluyeron usando el kit de elución en gel de Qiagen comercialmente disponible. El ADN se eluyó con agua de grado de biología molecular altamente pura.

15

20 **Clonación de los productos de PCR en vectores de secuenciación-**

Los productos amplificados por PCR y purificados en gel de agarosa se usaron después para la clonación en vector pTZ57R/T comercialmente disponible a través de un proceso de ligamiento de ADN. Las condiciones para el ligamiento de ADN se estandarizaron previamente.

20

25 Transformación de muestra ligada pTZ57R/T+CRISPR(PCR) en células competentes de *E.coli* DH5alpha - El ADN ligado se transformó en células competentes de *E. coli* DH5alpha, comercialmente disponibles. Se siguió el protocolo de transformación tal como se describe por el fabricante para lograr una eficacia de transformación de alto nivel. Tras la transformación, las células de *E. coli* se cultivaron en presencia de antibiótico ampicilina para el crecimiento de colonias transformadas.

30

Inoculación de células transformadas (pTZ57R/T+CRISPR(PCR)) en medio LB con ampicilina - Cada colonia separada se inoculó en caldo LB + Ampicilina en un volumen de cultivo de 5 ml y se cultivó toda la noche para el aislamiento de ADN plasmídico.

35

Aislamiento de ADN plasmídico (pTZ57R/T+CRISPR(PCR) de células transformadas DH5alpha - se usaron 4,5 ml del cultivo de toda la noche para el aislamiento de ADN plasmídico usando el kit de aislamiento de ADN plasmídico de QIAGEN comercialmente disponible siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN plasmídico se eluyó con agua de grado de biología molecular altamente pura.

40

4.3.5 Comprobación cruzada de los plásmidos para la presencia de inserciones - Se probó la presencia de inserciones en la preparación de cada plásmido usando enzimas de restricción adecuadas seguido por la electroforesis en gel de agarosa. El tamaño de la inserción se comparó con los patrones de peso molecular adecuados.

45

**Análisis de datos de secuencia e identificación de INDEL**

Secuenciación - Los plásmidos confirmados se secuenciaron después con cebadores de secuenciación específicos presentes en la estructura principal del vector pTZ57R/T. Los datos de la secuencia se generaron en instrumentos de secuenciación automática de ADN siguiendo los protocolos apropiados. La secuenciación se llevó a cabo con cebadores de secuenciación directos e inversos para asegurar la información de secuencia apropiada.

50

Análisis de secuencia de ADN - Se analizaron los datos de secuenciación de ADN de todos los plásmidos. Se comparó la secuencia de ADN de todos los ADN plasmídicos derivados de la línea celular CHOK1 de control y diversas líneas celulares clonales CHOK1 de inactivación de FUT8 mediada por CRISPR y líneas celulares clonales CHOK1 de inactivación de GMD mediada por CRISPR y se identificaron las diferencias en las secuencias de ADN. De cada clon de línea celular CHOK1, se generaron productos de PCR y se clonaron en *E. coli*. Se secuenciaron múltiples clones de *E. coli* para confirmar la modificación de la secuencia de nucleótidos en el locus genómico diana.

55

Se usó el análisis combinado de los datos de secuencia para identificar posibles líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8 y GMD en donde los loci genómicos de FUT8 y GMD se modifican a través de delección y/o inserciones (INDEL). Las secuencias de ADN se alinearon después para mostrar diferencias distintivas. Las Figuras 17A a 17G proporcionan la alineación de las secuencias de nucleótidos de la línea celular CHOK1 de control y FUT8 y las Figuras (17H a 17L) proporcionan las alineaciones de la secuencia de nucleótidos con las líneas celulares clonales de inactivación de GMD u la línea celular CHOK1 de control. Se usó la información de la secuencia de ADN para atribuir la secuencia de aminoácidos del gen FUT8 (exón 7). Usando el patrón de codones para el gen GMD, se analizaron las regiones de exón 3 y exón 4. Después se analizaron las secuencias de aminoácidos para identificar

60

65

deleciones, mutaciones de desplazamiento del marco, inserciones de codones de parada así como sustituciones de aminoácidos en posiciones específicas. Las figuras 17A a 17G representan el grado de modificación de nucleótidos observado en las líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8 y las figuras 17H a 17L en las líneas celulares CHOK1 de inactivación de GMD cuando se compara con la línea celular CHOK1 de control. Los datos proporcionan una representación de la organización del ADN genómico de FUT8 y GMD entre múltiples líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8 y GMD.

**Reacción de PCR**

En primer lugar, se desnaturalizó el molde de ADN de cadena doble a una temperatura elevada de 94 °C. Los cebadores específicos de secuencia mencionados en la Tabla 15 se hibridaron posteriormente (a 60,4 °C) con sitios que flanquean la secuencia diana. Una ADN polimerasa termoestable (polimerasa Phusion) prolongó (a 72 °C) los cebadores hibridados, duplicando de este modo la cantidad de secuencia de ADN original. Este producto recién sintetizado llegó entonces a ser un molde adicional para posteriores ciclos de amplificación. Estas tres etapas se repitieron durante 30 ciclos, dando como resultado un aumento de 10<sup>9</sup> veces en la concentración de ADN diana. Con el fin de añadir proyecciones de dATP al producto de PCR para el vector de clonación en TA, el producto amplificado por PCR de la polimerasa Phusion se incubó con la polimerasa Taq durante 20 minutos a 72 °C.

**Tabla 16**

<b>Desnaturalización inicial</b>	94 °C	3 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	30 segundos	30 ciclos
<b>Hibridación</b>	60,4 °C	50 segundos	
<b>Extensión</b>	72 °C	1 minuto	
<b>Extensión final</b>	72 °C	10 minutos	
<b>A lo largo del proceso</b>	4 °C		

**Tabla 17 - Condiciones de PCR**

<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>	<b>Control</b>
<b>Molde</b>	Respectivamente	0,0 µl
<b>dNTP</b>	1 µl	1 µl
<b>Cebador Directo</b>	1 µl	1 µl
<b>Cebador inverso</b>	1 µl	1 µl
<b>Polimerasa Phusion</b>	1 µl	1 µl
<b>Tampón de Phusion HF (5X)</b>	10 µl	10 µl
<b>Agua purificada</b>	Respectivamente	36 µl
<b>Mezcla de reacción total</b>	50 µl	50 µl

La Figura 15A de la presente divulgación representa la figura representativa del producto amplificado por PCR del clon de Fut8 en CRISPR/Cas (CR1-KI-T1 n.º 022) cuando corre en gel de agarosa al 1 %. El ADN genómico se aísla y se amplifica con los cebadores CRP\_P1\_Directo y CRP\_P01\_Inverso en condiciones de PCR estandarizadas. El producto amplificado se somete a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El carril 1 proporciona ADN genómico del clon CR1-KO-T1 n.º 022 amplificado con cebadores específicos y el carril 2 proporciona un patrón de peso molecular de ADN.

El resultado revela el tamaño del producto esperado del producto amplificado. El producto amplificado por PCR se purifica en gel y se clona en clones bacterianos y se secuencia para confirmar el estado del FUT8 genómico. La Figura 15B de la presente divulgación representa la figura representativa del producto amplificado por PCR de los clones de GMD con CRISPR/Cas representativos (GMD\_1.12 y GMD\_1.27) cuando corren en gel de agarosa al 1 %. El ADN genómico se aisló y se amplificó con el conjunto de cebadores GMD\_P01\_Directo y GMD\_P01\_Inverso y el conjunto de cebadores GMD\_P03\_Directo e GMD\_P03\_Inverso, en condiciones de PCR estandarizadas. El producto amplificado se somete a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El resultado revela el tamaño del producto esperado del producto amplificado. El producto amplificado por PCR se purifica en gel y se clona en clones bacterianos y se secuencia para confirmar el estado de las secuencias del exón 3 y el exón 4 de GMD.

En la Figura 15B, el carril 1 representa el ADN genómico del clon GMD\_1.12 amplificado con cebadores específicos, el carril 2 representa el ADN genómico del clon GMD\_1.27 amplificado con cebadores específicos, el carril 3 representa el patrón de peso molecular de ADN del marcador de ADN de 1 kb y el carril 4 representa el patrón de peso molecular de ADN del marcador de ADN de 100 pb.

Esta figura representativa describe la amplificación por PCR de los loci genómicos FUT8 y GMD usando las secuencias de cebador en la Tabla 15 y la polimerasa Phusion. El producto de PCR se modifica adicionalmente con

la ADN polimerasa Taq para la adición de ADN por cola homopolimérica. El producto final de la PCR se somete después a electroforesis en gel de agarosa para la elución del fragmento amplificado.

5 La figura 15C representa la ejecución representativa en gel de agarosa al 1 % con amplificación por PCR de ADN genómico de la línea celular clonal GMD 2.30 con cebadores específicos para el locus del exón 4 de GMD. el carril 1 representa el patrón de peso molecular de ADN con el marcador de ADN de 1 kb, el carril 2 representa el patrón de peso molecular de ADN del marcador de ADN de 100 pb y el carril 3 representa el ADN genómico del clon GMD2.30 amplificado con cebadores específicos.

10 Las figuras 15A, 15B y 15C revelan productos amplificados por PCR de tamaño apropiado y sometidos a electroforesis para elución en gel. Se aplicó el mismo proceso para amplificar el producto amplificado por PCR de las líneas celulares CHOK1 de control y de los clones CHOK1 de inactivación de Fut8 y de inactivación de GMD, que se extrajeron en gel usando el kit de extracción en gel QIAEX II.

15 **Ligamiento**

Los productos amplificados por PCR y eluidos en gel se unen en el vector comercialmente disponible pTZ57R/T. El protocolo de ligamiento se describe tal como sigue

20

**Tabla 18 - Mezcla de ligamiento**

ADN (pTZ57R/T)	1 µl
ADN (CRISPR(producto de PCR))	4 µl
ADN ligasa T4	1 µl
Tampón de ADN ligasa T4 (10X)	1 µl
Agua purificada	hasta 10 µl
Total	10 µl

La mezcla de ligamiento anterior se incubó a 4 °C toda la noche y el 50 % de la mezcla de ligamiento se transformó en células competentes de *E. coli* DH5alpha mediante el método del choque térmico.

25 **Transformación de la muestra ligada en células bacterianas mediante el método del choque térmico**

El fin de transformar células bacterianas es clonar y propagar el ADN plasmídico. Se tomaron alícuotas de 20 µl de *E. coli* competentes (DH5alpha) del congelador a -80 °C y se descongelaron en hielo durante 5 minutos. El 50 % de la muestra ligada (pTZ57R/T+CRISPR(PCR)) se añadió a las células competentes y se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 20 minutos. El tubo que contiene la mezcla se colocó en baño de agua/ baño seco a 42 °C durante 50 segundos. El tubo se volvió a colocar en hielo durante 2 minutos. Se incubaron 0,950 ml de caldo LB calentado a 37 °C (sin antibiótico ampicilina), se incubó a 37 °C, a 220 rpm durante 1 hora, en el agitador. Se diseminaron 100 µl del cultivo resultante en placas de cultivo de LB caliente + ampicilina. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C.

35

**Aislamiento de ADN plasmídico de células bacterianas usando QIAprep spin miniprep**

El fin de este procedimiento es crecer/cultivar bacterias que contienen un ADN plasmídico específico, que se usa en los siguientes experimentos. Se añadieron 5 ml de caldo LB + ampicilina en tubos esterilizados por autoclave, las colonias bacterianas aisladas se inocularon de las placas de cultivo a tubos de cultivo con caldo LB + ampicilina. Los tubos se incubaron a 220 rpm, a 37 °C toda la noche (aproximadamente 16-18 horas, en función del crecimiento de la bacteria). El cultivo de toda la noche de 4,5 ml se centrifugó a 13 rpm durante 1 minuto. El ADN plasmídico se aisló usando el kit de aislamiento de plásmido de QIAGEN. El ADN plasmídico se eluyó con agua de grado de biología molecular altamente pura y se almacenó en un congelador a -20 °C hasta su uso posterior.

45

**Clones positivos seleccionados usando la digestión por restricción con enzimas *EcoR I-HF* y *Hind III-HF***

El ADN plasmídico aislado de este modo se probó para la presencia de inserciones, en este caso, el fragmento amplificado por PCR. El vector pTZ57R/T contiene múltiples sitios de enzimas de restricción que flanquean el producto de PCR clonado. Los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII* se seleccionan para la digestión por restricción tal como se describe en la tabla a continuación. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 2 horas para la digestión completa de ADN plasmídico. Tras la digestión por restricción, la mezcla se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % durante 1 hora. La inserción del producto de PCR, si está presente, está separada de la estructura principal del vector pTZ57R/T y los clones bacterianos confirmados se usaron para la secuenciación de ADN.

55

**Tabla 19 - Digestión por enzimas de restricción- mezcla de reacción**

ADN (pTZ57R/T+CRISPR(productos de PCR))	2 µg
<i>EcoRI-HF</i>	1 µl
<i>Hind III-HF</i>	1 µl
Tampón cut smart (10X) de New England Bio labs	2 µl
Agua purificada	hasta 20 µl
Total	20 µl

5 Las figuras 16 A, 16B y 16C de la presente divulgación representan la digestión por enzimas de restricción representativas del producto amplificado por PCR en el vector pTZ57R/T para confirmar la presencia de inserciones de diferentes líneas celulares de inactivación. Las preparaciones de ADN plasmídico de clones bacterianos independientes se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII que flanquean el fragmento de PCR clonado en el vector y la mezcla se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El tamaño de los fragmentos de ADN resultantes se estimó a partir de los patrones de peso molecular de ADN.

10 La figura 16A representa la ejecución representativa en gel de agarosa al 1 % de digestión por restricción del plásmido pTZ57R/T con inserciones del producto de PCR. La digestión por restricción con EcoRI y HindIII da como resultado una inserción de 500 pb. La inserción representa el producto de PCR obtenido de la amplificación del ADN genómico de la línea celular CR1-KO-T1 n.º 022 con cebadores específicos para el locus del exón 7 de FUT8.

15 En la figura,

- Carril 1- Marcador de ADN de 100 pb
- Carril 2- pTZ57R/T+ CR1-KO-T1 n.º022 a [EcoRI-HF y HindIII-HF]
- Carril 3- pTZ57R/T+ CR1-KO-T1 n.º 022 b [EcoRI-HF y HindIII-HF]
- 20 Carril 4- pTZ57R/T+ CR1-KO-T1 n.º 022 c [EcoRI-HF y HindIII-HF]
- Carril 5- pTZ57R/T+ CR1-KO-T1 n.º 022 d [EcoRI-HF y HindIII-HF]
- Carril 6- pTZ57R/T+ CR1-KO-T1 n.º 022 d [Sin corte]

25 La figura 16B representa la ejecución representativa en gel de agarosa al 1 % de digestión por restricción del plásmido pTZ57R/T con inserciones del producto de PCR. La digestión por restricción con EcoRI y HindIII da como resultado una inserción de 500 pb. La inserción representa el producto de PCR obtenido de la amplificación del ADN genómico de la línea celular GMD1.27 con cebadores específicos para el locus del exón 3 de GMD.

30 En la figura,

- Carril 1- Marcador de ADN de 1 kb GeneRuler (Thermoscientific)
- Carril 2- pTZ57R/T+(CHO\_GMD\_1.27) a [BamHI-HF y XbaI]
- Carril 3- pTZ57R/T+(CHO\_GMD\_1.27) b [BamHI-HF y XbaI]
- Carril 4- pTZ57R/T+(CHO\_GMD\_1.27) c [BamHI-HF y XbaI]
- 35 Carril 5- pTZ57R/T+(CHO\_GMD\_1.27) d [BamHI-HF y XbaI]
- Carril 6- pTZ57R/T+(CHO\_GMD\_1.27) d [Sin corte]

40 La figura 16C representa la ejecución representativa en gel de agarosa al 1 % de digestión por restricción del plásmido pTZ57R/T con inserciones del producto de PCR. La digestión por restricción con EcoRI y HindIII da como resultado una inserción de 500 pb. La inserción representa el producto de PCR obtenido de la amplificación del ADN genómico de la línea celular GMD 2.30 con cebadores específicos para el locus del exón 4 de GMD.

45 En la figura,

- Carril 1- pTZ57R/T+( GMD\_2.30) a [Sin corte]
- Carril 2- pTZ57R/T+(GMD\_2.30) a [BamHI-HF y XbaI]
- Carril 3- pTZ57R/T+(GMD\_2.30) b [BamHI-HF y XbaI]
- Carril 4- pTZ57R/T+(GMD\_2.30) c [BamHI-HF y XbaI]
- Carril 5- pTZ57R/T+(GMD\_2.30) d [BamHI-HF y XbaI]
- 50 Carril 6- Marcador de ADN de 1 kb

55 Los resultados revelan que todos los clones que portaban inserciones de producto de PCR de longitud prolongada. La estructura principal del vector pTZ57R/T se representa mediante el fragmento observado a una posición de banda de aproximadamente 5,4 Kb. Basándose en estos datos, se seleccionaron muestras individuales de ADN plasmídico y se usaron para la secuenciación de ADN. Se aplicó el mismo proceso a todos los productos de PCR clonados en el vector pTZ57R/T y los clones confirmados se seleccionaron para la secuenciación de ADN. El resultado indica la presencia de inserciones que se secuenciaron con los cebadores de secuenciación presentes en la estructura principal del vector.

**Ejemplo 6: CONFIRMACIÓN DE LAS INDEL POR SECUENCIACIÓN**

5 La secuenciación del ADN plasmídico bacteriano seleccionado se realizó con cebadores de secuenciación aguas arriba y aguas abajo localizados en la estructura principal del vector pTZ57R/T. Los datos de secuenciación se recopilaron usando ambos cebadores y se analizaron para determinar la información de secuencia de ADN adecuada. Se secuenciaron múltiples plásmidos bacterianos y se secuenciaron para generar información combinada de secuencias de ADN en los loci genómicos diana de FUT8 y GMD para la línea celular CHOK1 de control y las líneas celulares clonales CHOK1 de inactivación de FUT8 y las líneas celulares clonales de inactivación de GMD  
10 logradas a través del complejo CRISPR/Cas.

A continuación se proporcionan secuencias de ADN genómico de la línea celular CHOK1 de control y las líneas celulares clonales CHOK1 de inactivación de FUT8 y GMD, lo que confirma la presencia de mutaciones de inserción y/o deleción en el gen Fut8 y en el gen GMD, respectivamente, mediante construcciones de CRISPR, de acuerdo con el método de la presente divulgación. El locus genómico dirigido amplificado de cada línea celular que incluye la línea celular CHOK1 de control se clonó como productos de PCR en múltiples clones bacterianos independientes. La verificación de la secuencia se llevó a cabo tanto con cebadores de secuenciación directos e inversos de múltiples clones bacterianos independientes (que varían de 5-15) para entender la variabilidad alélica de los loci diana FUT8 y GMD. Los datos de secuencia de ADN a continuación son representativos de secuencias genómicas en el locus dirigido FUT8 de diversas líneas celulares de inactivación de FUT8.  
15  
20

**Análisis de secuencia de ADN**

25 Línea celular **CHOK1** de control (tipo silvestre) - la secuencia del Exón 7 del gen FUT8 está en mayúsculas. La secuencia del intrón está en minúsculas y subrayado.

aagaaataagctgaatcagctctgacttattgtgtgatttcaatacctgtgaccaaagagaagttaactccttatatctttatcttattgtttctct  
ggaagAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAG  
GCTGTGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGG  
CACCCAGCGAACACTCATCTTGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATG  
GGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCAC  
TGGACACTGGTCAGgtaaggagcatgtgcacatgaaagatctctggttaggtcagattagcac

30 Las secuencias de la línea celular clonal CHOK1 de inactivación de FUT8 se proporcionan a continuación. Se observa que la secuencia del exón 7 está mutada en las líneas celulares.

**CR1KOT1 n.º 023**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
CAGCGAACATTGGATATTGGGAAGAATTAGAGTTGAGGATGGGAGACTGTGTTTAG  
ACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAG  
35

**CR1KOT1 n.º 018**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
CAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGA  
GACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAG

40 **CR1KOT1 n.º 055**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
CAGCGCACTCATCTTGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGAC  
TGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACA  
CTGGTCAG

**CR1KOT1 n.º 044**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTCTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
CAGCGAACACTCATCTCTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGAC  
ATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAG

5

**CR1KOT1 n.º 022**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
CAGCGAACACTCATCTTGAATCTCAGAATTGGCACACAGATCCTGGACTCCCGGAT  
GAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCC  
TATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGA  
CAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCAG

10

**CR1KOT1 n.º 036**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
CAGCGAACACTCACACTCATCTTGAATCTCAGAATTGGAATCTCATCTTGAATCT  
CAGAATTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTA  
GACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACACTGGTCA  
G

15

**CR1KOT1 n.º 037**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACA  
CTCATTATCCTCGGGGGAGCAGCCACTCAAATTTGGCGCTATGCTACTGGAGGATG  
GGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCAC  
TGGACACTGGTCAG

20

**CR1KOT1 n.º 051**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
 TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
 CAAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAG  
 ACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACTGGTCAG

**CR1KOT1 n.º 052**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
 TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
 CAGCGAACACTCATCTTGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGTACTGGAGGA  
 TGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCC  
 ACTGGACTGGTCAGG

5

**CR1KOT1 n.º 059**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
 TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
 CAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTTTGGAATCTCAGAATTGGCG  
 CTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGG  
 TCTGGCCTCTCCACTGGACTGGTCAG

10

**CR1KOT1 n.º 061**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
 TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTTATGGCACC  
 CAGCGAACACTCATCTTGGAATCTGTGTTTAGACCTGTAAGTGAGACATGCACAGAC  
 AGGTCTGGCCTCTCCACTGGACTGGTCAG

15

**CR1KOT1 n.º 067**

AATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAGAAAGCTGGTATGTAATATCAACAAAGGCTG  
 TGGCTATGGATGTCAACTCCATCATGTGGTTTACTGCTTCATGATTGCTCATCTTGGA  
 ATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATGGGAGACTGTGTTTAGACCTGTAAG  
 TGAGACATGCACAGACAGGTCTGGCCTCTCCACTGGACTGGTCAG

20

En la figura 17 de la presente divulgación se proporciona la alineación representativa de secuencia de ADN genómico en clones de la línea celular de inactivación de FUT8 que muestra delección en la secuencia del gen FUT8. Las figuras 17A a 17G representan el análisis de secuencia de nucleótidos en el locus diana del exón 7 de Fut8. El ADN genómico de los clones CHOK1 de inactivación de FUT8 transfectados con CRISPR/Cas y las líneas celulares CHOK1 de control se usaron para amplificar por PCR el locus FUT8 genómico direccionado. Los datos de la secuencia se recolectaron del análisis de 5-15 clones bacterianos independientes secuenciados con cebadores de secuenciación directos e inversos. Los datos de la secuenciación sugieren delecciones de longitudes variables en múltiples clones en comparación con la línea celular CHOK1 de control. La delección de bases más grande se observó en el clon CR1KOT1 n.º 061 y la delección más pequeña es de solo 2 bases en el clon CR1KOT1 n.º 055. Todas las delecciones se localizaron en el sitio diana de CRISPR/Cas.

25

30

En la figura 17A, los sitios de unión a ADN de CRISPR/Cas a la izquierda y a la derecha se indican mediante recuadros abiertos. Las figuras 17B a 17G indican múltiples clones en donde los datos de secuencia revelaron inserción de nueva secuencia de ADN en comparación con la línea celular CHOK1 de control. La Figura 17B y la

5 Figura 17F que representan los números de clones CR1KOT1 n.º 023 y CR1KOT1 n.º 052 relevaron tanto inserción como delección de secuencias en comparación con la secuencia genómica de CHOK1. El clon número CR1KOT1 n.º 037 (figura 17E) reveló una inserción única y un extenso error de emparejamiento de bases en comparación con la secuencia genómica de CHOK1. La inserción de bases también varió en longitud tal como se muestra en las figuras 17B a 17G.

10 Los datos sugieren diversos INDEL presentes en el locus genómico FUT8 en las líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8. En muchos casos, se observó que hay modificaciones muy específicas en las bases direccionadas, y en otros casos, los cambios son amplios e implican tramos más largos de ADN. Tal diversidad de modificación genómica a lo largo del complejo CRISPR/Cas es posible debido a las roturas de cadena simple de ADN endógeno en estrecha cercanía y a la reparación a través de la unión de extremos no homólogos. Todas estas

15 líneas celulares se seleccionaron a través de un ensayo de cribado funcional, a saber, un ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC. Los resultados también implican una alta eficacia de los ensayos funcionales para aislar e identificar la línea celular CHOK1 de inactivación de FUT8.

20 También se revela que el diseño del complejo CRISPR/Cas representado en la presente divulgación es único, ya que este par de complejos CRISPR/Cas con la endonucleasa Cas9n proporciona una alteración de secuencia génica altamente específica en el locus direccionado FUT8 de las líneas celulares CHOK1.

**Análisis de secuencia de ADN de células CHOK1 transfectadas con el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) para el direccionamiento del exón 3 del gen GMD**

25 Línea celular CHOK1 de control (tipo silvestre) - la secuencia del Exón 3 del gen GMD está en mayúsculas. La secuencia del intrón está en minúsculas y subrayado.

gatccttcagtggtccaagtactgggttgcaggggtgggcagtcacacctgggaacaccagtttgaccttcattttcatatgtgaataatacat  
atttcagtttgatattgaaatgtttctctgttatctcatatcttgatgatcttttataaatcttaaagACATGAAGTTGCACTATGG  
TGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAATCATCAATGAAGTCAAACCTACAG  
AGATCTACAATCTTGGTGCCAGAGCCATGTCAAAGgtaagctcttctcattgccaatggcttctttggctgtgc  
ctttgtagtgttctctattcactcacattgtgtttctcaatacaatagcaaccactagttcttatcaagtttagtcttcagtttagttgggaattcat  
cctaataaaaatactcataaattttaaggtgaggttctgttactcaacag

30 Las secuencias de la línea celular clonal CHOK1 de inactivación de GMD se proporcionan a continuación. Se observa que la secuencia del exón 3 está mutada en las líneas celulares.

**GMD\_1.12**

35 ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGTGTTTTGGCACCAAAT  
CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGAGAA  
TCGCGCAGGGGAATGGCCTGCCGCACTTTCTGGCGGGCAGAAACAGCGAGTGGCGC  
TGGCAAGAGCGTTGATTCATCGACCGGGATTATTGTTGCGTGATGAACCGCTCGGGG  
CGCTGGACGCCTTAACGCGACTCGAGATGCAGGATTTGATTGTGTCTAGTAAAAATC  
ATCAATGAAGTCAAACCTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCAGAGCCATGTCAA  
G

40 **GMD\_1.27**

ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTGAAGTCAAAC  
CTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCAGAGCCATGTCAAAG

**GMD\_1.37**

ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAATCATCT  
GACCGCCAGGTCGTAAAATCATCAATGAAGTCAAACCTACAGAGATCTACAATCTT  
GGTGCCCAGAGCCATGTCAAG

5 **GMD\_1.41**

TAGATCTCTGTAGGTTTGACTTCATTGATGAAGATCTACAATCTTGGTGCCCAGAGC  
CATGTCAAG

**GMD\_1.43**

10

TGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAAATCATCAATGAAGTCAAACCT  
ACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCCAGAGCCATGTCAAG

**GMD\_1.44**

15

ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGATGAAGTCAAACCTACAGAGATCTAC  
AATCTTGGTGCCCAGAGCCATGTCAAG

**Análisis de secuencia de ADN de células CHOK1 transfectadas con el complejo CRISPR/Cas pD1301 (ARNg 404) para el direccionamiento del exón 4 del gen GMD**

20 Línea celular CHOK1 de control (tipo silvestre) - la secuencia del Exón 4 del gen GMD está en mayúsculas. La secuencia del intrón está en minúsculas y las localizaciones del cebador están subrayadas.

gacgtagtcttcagctattctatactggaagtagatgatattctcattggaaattctgttaggaagtaacccttctgtcttcttacctgcatagaatc  
ccaggatataaaacttgctgtgctgccccttgccattgtctctcactggtggcctttattgcatctcatatctgcccttctcttccagATTTCCT  
TTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTGATGGAGTTGGCACCTTGCGGCTTCTGG  
ATGCAATTAAGACTTGTGGCCTTATAAATTCTGTGAAGTTCTACCAGGCCTCAACTA  
GTGAACTGTATGGAAAAGTGCAAGAAATACCCCAAGAGACCACCCCTTTCTAT  
CCAAGGTCGCCCTATGgtaagaattcctgtgccagctgtatgtgaggctctctgcaggtgtgggatgtttctgcttcttctctg

25

cac

La secuencia de la línea celular clonal CHOK1 de inactivación de GMD se proporciona a continuación. Se observa que la secuencia del exón 4 está mutada en la línea celular clonal.

30 **GMD 2.30**

ATTTCCTTTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTGATGGAGTTGGCACTTCTGGA  
TGCAATTAAGACTTGTGGCCTTATAAATTCTGTGAAGTTCTACCAGGCCTCAACTAG  
TGAAGTGTATGGAAAAGTGCAAGAAATACCCCAAAAAGAGACCACCCCTTTCTATC  
CAAGGTCGCCCTATG

35 **Análisis de secuencia de ADN de células CHOK1 transfectadas con el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404) para el direccionamiento del Exón 3 y el Exón 4 del gen GMD**

La secuencia de la línea celular clonal CHOK1 de inactivación de GMD se proporciona a continuación. Se observa que aunque se transfectaron ambos complejos CRISPR/Cas, solo se observaron mutaciones de nucleótidos en el exón 4. El análisis de la secuencia del Exón 3 reveló el Exón 3 de tipo silvestre en la línea celular clonal de inactivación.

5 **GMD\_3.51**

Secuencia del Exón 3 -

ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAATCATCA

10 ATGAAGTCAAACCTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCAGAGCCATGTCAAG

Secuencia del Exón 4 -

ATTCCTTTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTGAGACTTGTGGCCTTATAAATT

CTGTGAAGTTCTACCAGGCCTCAACTAGTGAAGTGTATGGAAAAGTGCAAGAAATA

15 CCCCAGAAAGAGACCACCCCTTTCTATCCAAGGTCGCCCTATG

Tabla que muestra e listado de secuencias de las líneas celulares de inactivación de GMD desarrolladas mediante transfección con el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207).

**Tabla 20**

Información de la línea celular	Estructura genética en el locus genómico diana de GMD	Datos de secuenciación de ADN
CHOK1 control	Tipo silvestre	ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCC TAGTAAAAATCATCAATGAAGTCAAACCTACAGAGATCTAC AATCTTGGTGCCAGAGCCATGTCAAG
GMD_1.12	Desplazamiento del marco y codón de parada	ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGTG TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAAT AACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGAGAATCGCGCAGGGGA ATGGCCTGCCGCACTTTCTGGCGGGCAGAAACAGCGAGTGG CGCTGGCAAGAGCGTTGATTCATCGACCGGATTATTGTTGC GTGATGAACCGCTCGGGGCGCTGGACGCCTTAACGCGACTC GAGATGCAGGATTTGATTGTGTCTAGTAAAAATCATCAATGA AGTCAAACCTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCAGAGCC ATGTCAAG
GMD_1.27	Desplazamiento del marco	ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCC TAGTGAAGTCAAACCTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCCA GAGCCATGTCAAG
GMD_1.37	Desplazamiento del marco y codón de parada	ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCC TAGTAAAAATCATCTGACCGCCAGGTCGTAAAATCATCAATG AAGTCAAACCTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCAGAGC CATGTCAAG
GMD_1.41	Codón de parada y delección	TAGATCTCTGTAGTTTACTTCATTGATGAAGATCTACAAT CTTGGTGCCAGAGCCATGTCAAG

GMD_1.43	<b>Desplazamiento del marco y codón de parada</b>	TGGTGACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAAATCATCA ATGAAGTCAAACCTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCCAG AGCCATGTCAAG
GMD_1.44	<b>Delección</b>	ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGATGAAGTCAAA CCTACAGAGATCTACAATCTTGGTGCCCAGAGCCATGTCAAG

Tabla que muestra e listado de secuencias de las líneas celulares de inactivación de GMD desarrolladas mediante transfección con el complejo CRISPR/Cas pD1301 (ARNg 404).

5 **Tabla 21**

Información de la línea celular	Estructura genética en el locus genómico diana de GMD	Datos de secuenciación de ADN
CHOK1 control de	Tipo silvestre	ATTCCTTTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTGATG GAGTTGGCACCTTGCGGCTTCTGGATGCAATTAAGACTTG TGGCCTTATAAATTCTGTGAAGTTCTACCAGGCCTCAACT AGTGAAGTGTATGGAAAAGTGCAAGAAATACCCCAGAAA GAGACCACCCCTTTCTATCCAAGGTCGCCCTATG
GMD_2.30	<b>Desplazamiento del marco y codón de parada</b>	ATTCCTTTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTGATG GAGTTGGCACTTCTGGATGCAATTAAGACTTGTGGCCTTA TAAATTCTGTGAAGTTCTACCAGGCCTCAACTAGTGAAGT GTATGGAAAAGTGCAAGAAATACCCCAAAAAGAGACCAC CCCTTTCTATCCAAGGTCGCCCTATG

Tabla que muestra e listado de secuencias de las líneas celulares de inactivación de GMD desarrolladas mediante transfección con el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404).

10 **Tabla 22**

Información de la línea celular	Estructura genética en el locus genómico diana de GMD	Número del exón	Datos de secuenciación de ADN
CHOK1 control de	Tipo silvestre	Exón 3	ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCA CCTGCCTAGTAAAAATCATCAATGAAGTCAAACCTA CAGAGATCTACAATCTTGGTGCCCAGAGCCATGTCA AG
	Tipo silvestre	Exón 4	ATTCCTTTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTG ATGGAGTTGGCACCTTGCGGCTTCTGGATGCAATTA GACTTGTGGCCTTATAAATTCTGTGAAGTTCTACCAG GCCTCAACTAGTGAAGTGTATGGAAAAGTGCAAGAA ATACCCAGAAAGAGACCACCCCTTTCTATCCAAGG TCGCCCTATG
GMD_3.51	Tipo silvestre	Exón 3	ACATGAAGTTGCACTATGGTGACCTCACCGACAGCA CCTGCCTAGTAAAAATCATCAATGAAGTCAAACCTA CAGAGATCTACAATCTTGGTGCCCAGAGCCATGTCA AG

	<b>DELECIÓN</b>	Exón 4	ATTTCTTTGACTTAGCAGAGTACACTGCAGATGTTG AGACTTGTGGCCTTATAAATTCTGTGAAGTTCTACCA GGCCTCAACTAGTGAAGTGTATGGAAAAGTGCAAGA AATACCCAGAAAAGAGACCACCCCTTTCTATCCAAG GTCGCCCTATG
--	-----------------	--------	--

En la figura 17H a17L de la presente divulgación se proporciona la alineación representativa de secuencia de ADN genómico en clones de la línea celular CHOK1 de inactivación de GMD que muestran delección en la secuencia del gen GMD. Las figuras 17H a 17L representan el análisis de secuencia de nucleótidos en el locus diana de GMD. El ADN genómico de los clones CHOK1 de inactivación de GMD transfectados con CRISPR/Cas y las líneas celulares CHOK1 de control se usaron para amplificar por PCR los loci de GMD genómicos direccionados, tanto las secuencias del exón 3 como del exón 4. Los datos de la secuencia se recolectaron del análisis de 5-15 clones bacterianos independientes secuenciados con cebadores de secuenciación directos e inversos. Los datos de la secuenciación sugieren deleciones de longitudes variables en múltiples clones en comparación con la línea celular CHOK1 de control. La delección de bases más grande se observó en el clon GMD1.41 y la delección más pequeña es de solo 8 bases en el clon GMD 2.30. Todas las deleciones se localizaron en el sitio diana de CRISPR/Cas.

En la figura 17H, los sitios de unión a ADN de CRISPR/Cas a la izquierda y a la derecha se indican mediante recuadros abiertos. En la figura 17K, el sitio de unión a CRISPR/Cas se indica mediante un recuadro abierto. Las figuras 17I a 17J indican clones en donde los datos de secuencia revelaron inserción de nueva secuencia de ADN en comparación con la línea celular CHOK1 de control. La figura 17K releva una pequeña delección en el sitio diana del exón 4 de GMD con inserción de CRISPR/Cas pD1301 (ARNg 404) que es el resultado de una rotura de ADN de cadena doble. La figura 17L representa los datos de secuencia de la línea celular CHOK1 de inactivación de GMD transfectada con dos construcciones de CRISPR/Cas, pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404) en donde solo la secuencia del exón 4 de GMD se modifica con una delección de 36 pares de bases.

Los datos sugieren diversos INDEL presentes en el locus genómico GMD en las líneas celulares CHOK1 de inactivación de GMD. En muchos casos, se observó que hay modificaciones muy específicas en las bases direccionadas, y en otros casos, los cambios son amplios e implican tramos más largos de ADN. Tal diversidad de modificación genómica a lo largo del complejo CRISPR/Cas es posible debido a las roturas de cadena simple de ADN y roturas de cadena doble de ADN y la posterior reparación de ADN. Todas estas líneas celulares se seleccionaron a través de un ensayo de cribado funcional, a saber, un ensayo de citometría de flujo con LCA-FITC. Los resultados también implican una alta eficacia de los ensayos funcionales para aislar e identificar la línea celular CHOK1 de inactivación de GMD.

También se revela que el diseño del complejo CRISPR/Cas representado en la presente divulgación es único, ya que este par de complejos CRISPR/Cas con la endonucleasa Cas9n proporciona una alteración de secuencia génica altamente específica en el locus direccionado de GMD de las líneas celulares CHOK1.

**Análisis de secuencia de aminoácidos de las líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8**

Las secuencias de ADN genómico de FUT8 de las líneas celulares CHOK1 de control y CJOK1 de inactivación de FUT8 se analizaron posteriormente para comprender el impacto de la INDEL de la secuencia de ADN sobre el estado de la proteína FUT8. Las secuencias de ADN en el locus de FUT8 se traducen a secuencias de aminoácidos que usan el sesgo de codón de vertebrados. Se estudió de cerca la secuencia de aminoácidos de la región del exón 7 y los resultados se resumen en la tabla 23. Cuando se comparó con la línea celular CHOK1 de control, las líneas celulares de inactivación de FUT8 revelaron modificaciones que implican deleciones e inserción de aminoácidos así como introducción de codones de parada y mutaciones de desplazamiento del marco. Se observó que se obtenían deleciones de 10 aminoácidos o de tramos más largos de secuencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la proteína FUT8 de CHOK1.

En muchos casos, se observaron mutaciones de desplazamiento del marco, que alteran la región de C-terminal de la proteína FUT8 para hacer no funcional a la enzima. Además, en varios casos, se introdujo un codón de parada como un efecto de la mutación de desplazamiento del marco y, por lo tanto, la proteína FUT8 era truncada y no funcional en estos clones.

**Tabla 23**

Información de la línea celular	Estructura genética en el locus genómico diana de FUT8	Secuencia de aminoácidos derivada de los datos de secuenciación de ADN
Línea celular CHOK1 de control	Secuencia de aminoácidos de FUT8 de tipo silvestre	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLILESQNWR YATGGWETVFR PVSETCTDRSGLSTGHWS
CR1KOT1 n.º 018	Mutante de delección	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQNWRYATGGWETVFRPVSETCT DRSGLSTGHWS
CR1KOT1 n.º 055	Desplazamiento del marco con CODÓN DE PARADA	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLHGLISELALCYWRMGDCV*
CR1KOT1 n.º 044	Mutante de delección	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLISGGWETVFRPVSETCTDRS GLSTGHWS
CR1KOT1 n.º 022	Desplazamiento del marco con CODÓN DE PARADA	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLILESQNWH TDPGLPDEH*
CR1KOT1 n.º 036	Desplazamiento del marco con CODÓN DE PARADA	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLTLILESQNWNLILESQNWNL RIGAMLLEDGRLCLDL*
CR1KOT1 n.º 037	Desplazamiento del marco con CODÓN DE PARADA	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTLIILGGAATQILALCYWRMGDCV*
CR1KOT1 n.º 051	Desplazamiento del marco con CODÓN DE PARADA	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQIGAMLLEDGRLCLDL*
CR1KOT1 n.º 052	INSERCIÓN con marco	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLILRTLILESQNCTGGWETVF RPVSETCTDRSGLSTGHWS
CR1KOT1 n.º 059	Desplazamiento del marco con CODÓN DE PARADA	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLILESQNWRFGISELALLE DG RLCLDL*
CR1KOT1 n.º 061	DELECIÓN	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLILES VFRPVSETCTDRSGLST GHWS
CR1KOT1 n.º 067	Desplazamiento del marco con CODÓN DE PARADA	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIAHLGISELALCYWRMGDCV*
CR1KOT1 n.º 023	Desplazamiento del marco con CODÓN DE PARADA	NPKDCSKARKLVCNINKGCGYGCQLHHVVY CFMIA YGTQRTLDIGKN*

Asimismo, se observó que la selección de los aminoácidos diana en la secuencia de la proteína FUT8 es altamente eficaz. El direccionamiento de los aminoácidos conservados en las posiciones de la proteína FUT8 de tipo silvestre con solo un par de complejos CRISPR/Cas ha creado mutaciones en el locus dirigido en múltiples líneas celulares de inactivación.

5 La alineación de secuencias de aminoácidos representativas en las líneas celulares CHOK1 de control y CHOK1 transfectada con CRISPR/Cas que presentan la delección en la secuencia génica de FUT8 se proporcionan en la Figura 18A y 18B de la presente divulgación. La secuencia de aminoácidos traducida se predijo usando el patrón de  
10 inserción de nucleótidos observada. Los clones CR1KOT1 n.º 018, CR1KOT1 n.º 044, CR1KOT1 n.º 061, CR1KOT1 n.º 055, CR1KOT1 n.º 067 y CR1KOT1 n.º 051 revelaron la delección dirigida de posiciones específicas de aminoácidos. En los números de clones CR1KOT1 n.º 052, CR1KOT1 n.º 022, CR1KOT1 n.º 036, CR1KOT1 n.º 059, CR1KOT1 n.º 023 y CR1KOT1 n.º 037, se observa la adición de aminoácidos en la región dirigida (figura 18B).  
15 Algunos de los clones revelaron delección seguida por mutaciones de desplazamiento de marco en codones de parada temprana. Todas estas modificaciones indicaron proteína FUT8 no funcional en las líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8 transfectadas pro CRISPR/Cas.

Además, el complejo CRISPR/Cas crea mutaciones de desplazamiento del marco seguidas por codones de parada que alteran la región de C-terminal de la enzima FUT8 que contiene un motivo importante II y un motivo III en el plegamiento de Rossmann. Las posiciones de los aminoácidos específicos Tyr-382, Asp-409, Asp-410, Asp-453 y  
20 Ser-469 que están implicados en el dominio catalítico de la enzima FUT8, por lo tanto, no se expresan en estas versiones truncadas del gen FUT8. El resultado final de estas mutaciones críticas es una enzima  $\alpha$ -1,6 fucosiltransferasa no funcional, el producto de proteína del gen FUT8 en las líneas celulares CHOK1 de inactivación de FUT8.

25 **Análisis del locus del exón 3 del gen GMD en líneas celulares clonales transfectadas con el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207).**

Las líneas clonales de inactivación revelaron diferentes tipos de mutaciones en la secuencia de proteína del gen GMD en la región diana. La tabla de a continuación enumera todas las mutaciones observadas en las líneas  
30 celulares clonales de inactivación de GMD.

**Tabla 24**

Información de la línea celular	Estructura genética en el locus genómico diana de GMD	Secuencia de aminoácidos derivada de los datos de secuenciación de ADN
CHOK1 de control	Tipo silvestre	<b>MKLHYGDLTDSTCLVKIINEVKPTEIYNLGAQS HVK</b>
GMD_1.12	Desplazamiento del marco y codón de parada	MKLHYGDLTDSTCVLAPKSTGLSKMS**PRPVDA NGESRRGMACRTFWRAETASGAGKSVDSSSTGIIV A**TARGAGRLNATRDAGFDCV**KSSMKSNLQR STILVPRAMS
GMD_1.27	Desplazamiento del marco	MKLHYGDLTDSTCLVKSNLQRSTILVPRAMS
GMD_1.37	Desplazamiento del marco y codón de parada	MKLHYGDLTDSTCLVKII*PPGRKIINEVKPTEIYN LGAQSHVK
GMD_1.41	Parada y delección	*ISVGLTSLMKIYNLGAQSHVK
GMD_1.43	Desplazamiento del marco y codón de parada	VTSPTAPA**KIINEVKPTEIYNLGAQSHVK
GMD_1.44	Delección	MKLHYGDLTD_____EVPKTEIYNLGAQSHVK

35 **Análisis del locus del exón 4 del gen GMD en líneas celulares clonales transfectadas con el complejo CRISPR/Cas pD1301 (ARNg 404):**

Las líneas celulares clonales de inactivación revelaron mutaciones en la secuencia de proteína del gen GMD en la región diana. La tabla de a continuación enumera todas las mutaciones observadas en la línea celular clonal de

inactivación de GMD.

**Tabla 25**

Información de la línea celular	Estructura genética en el locus genómico diana de GMD	Secuencia de aminoácidos derivada de los datos de secuenciación de ADN
CHOK1 control	Tipo silvestre	ISFDLAEYTADVDGVTGTLRLLDAIKTCGLINSVK FYQASTSELYGKVQEIPQKETTPFYPRSPY
GMD_2.30	Desplazamiento del marco y codón de parada	ISFDLAEYTADVDGVTSGCN*DLWPYKFCEVL PGLN**TVWKSARNTPKRDHPFLSKVAL

5 **Análisis de los loci del exón 3 y el exón 4 del gen GMD en la línea celular clonal transfectada con el complejo CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404):**

La línea celular clonal de inactivación reveló mutaciones solo en la secuencia de proteína del exón 4 del gen GMD entre las regiones diana. La tabla de a continuación enumera todas las mutaciones observadas en la línea celular clonal de inactivación de GMD.

10

**Tabla 26**

Información de la línea celular	Estructura genética en el locus genómico diana de GMD	Número del exón	Secuencia de aminoácidos derivada de los datos de secuenciación de ADN
CHOK1 control	Tipo silvestre	Exón 3	MKLHYGDLTDSTCLVKIINEVKPTEIYNL GAQSHVK
	Tipo silvestre	Exón 4	ISFDLAEYTADVDGVTGTLRLLDAIKTCG LINSVKFYQASTSELYGKVQEIPQKETTP FYPRSPY
GMD_3.51	Tipo silvestre	Exón 3	MKLHYGDLTDSTCLVKIINEVKPTEIYNL GAQSHVK
	Deleción	Exón 4	ISFDLAEYTADV _____ETCGLI NSVKFYQASTSELYGKVQEIPQKETTPFY PRSPY

15

La Figura 18C representa el análisis de aminoácidos de los clones CHOK1 de inactivación de GMD generados mediante el uso de pD1401 (ARNg 167-207). Se observan múltiples tipos de mutaciones en el locus diana del exón 3 de GMD que incluyen la deleción de restos de aminoácidos, la sustitución así como codones de parada prematura. Tales modificaciones producen el gen GMD no funcional y, por lo tanto, dan como resultado líneas celulares de inactivación de fucosa. Los clones número GMD 1.12 y GMD 1.37 revelaron la inserción de restos de aminoácidos y mutaciones de desplazamiento del marco que introdujeron codones de parada prematura (figura 18D y 18E). En el caso del clon GMD 2.30, cuando se usó pD1301 (ARNg 404) para la introducción de rotura de cadena doble de ADN se reveló la inserción y mutaciones de desplazamiento del marco en el locus diana del exón 4 de GMD (figura 18 F). De manera similar, en el clon GMD 3.51 (figura 18G) los datos revelaron deleción de aminoácidos solo en el exón 4 de GMD aunque la línea celular se generó mediante transfección con las construcciones CRISPR/Cas pD1401 (ARNg 167-207) y pD1301 (ARNg 404).

20

25

Estos datos revelan que el diseño de CRISPR/Cas hecho para direccionar dos sitios diana del exón específicos del gen GMD es muy específico y ambas construcciones son eficaces en el direccionamiento específico. La línea celular CHOK1 de inactivación de GMD desarrollada de este modo se usó para el desarrollo de anticuerpos monoclonales no fucosilados.

30

**Ejemplo 7 - USO DE LÍNEA CELULAR DE INACTIVACIÓN DE FUCOSA PARA PRODUCIR ANTICUERPOS PARCIALMENTE FUCOSILADOS Y NO FUCOSILADOS**

El soporte de expresión de células CHOK1 de inactivación de fucosa se usó para la expresión de anticuerpos no fucosilados, en particular, anticuerpos monoclonales parcialmente no fucosilados. Los genes de anticuerpos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de los anticuerpos monoclonales se clonaron en los plásmidos adecuados de expresión de genes y se transfectaron en el soporte celular CHOK1 de inactivación de fucosa descrito en los ejemplos anteriores. El anticuerpo monoclonal producido usando este soporte/método se expresó como un anticuerpo no fucosilado. El producto se purificó siguiendo los protocolos y las directrices establecidas para desarrollar un producto de anticuerpo monoclonal biomejorado para uso terapéutico. El anticuerpo no fucosilado biomejorado producido usando este soporte da como resultado un nivel mayor de ADCC y, por lo tanto, mejores resultados terapéuticos.

Los datos de citometría de flujo con LCA-FITC y los posteriores experimentos de secuenciación de la presente divulgación confirman que las líneas FKO son incapaces de fucosilar proteínas de membrana. Por tanto, la célula obtenida en la presente divulgación produce proteínas no fucosiladas, específicamente anticuerpos o fucosilados. Los aspectos característicos y las ventajas terapéuticas de los anticuerpos no fucosilados, tales como mayor ADCC, con conocidas para un experto en la materia.

Las líneas celulares CHOK1 de inactivación de GMD son útiles en aplicaciones únicas en programas de desarrollo de anticuerpos monoclonales no fucosilados. El gen GMD está aguas arriba e la etapa crítica de GDP-Fucosa en la vía de la biosíntesis de fucosa. Se puede producir GDP-fucosa en células CHOK1 bien por la vía de novo que depende por completo de la función del gen GMD o a través de la vía de rescate que es independiente de la función del gen GMD pero requiere la presencia de L-Fucosa en medio de cultivo. Por lo tanto, es posible lograr una regulación condicional de la fucosilación de anticuerpos monoclonales producidos en las líneas celulares de inactivación de GMD.

Supuesto 1: Expresión génica de anticuerpos monoclonales en células CHOK1 de inactivación de GMD sin L-Fucosa en el medio de cultivo. El anticuerpo monoclonal producido está afucosilado al 100 %. En este caso, tanto la vía de la biosíntesis de fucosa *de novo* como la de rescate son no funcionales.

Supuesto 2: Expresión génica de anticuerpos monoclonales en células CHOK1 de inactivación de GMD con L-Fucosa óptima en el medio de cultivo. El anticuerpo monoclonal producido está fucosilado al 100 %. En este caso, la vía *de novo* está completamente bloqueada pero la vía de rescate es funcional. Esto permite la fucosilación completa del gen del anticuerpo monoclonal producido en la línea celular CHOK1 de inactivación de GMD

Supuesto 3: Expresión génica de anticuerpos monoclonales en células CHOK1 de inactivación de GMD con diversos niveles de L-Fucosa en el medio de cultivo. El anticuerpo monoclonal producido en esta condición está parcialmente fucosilado. La dosificación de L-Fucosa en el medio de crecimiento determina el nivel de fucosilación del anticuerpo monoclonal. Esta dosificación se titula durante la condición del cultivo para asegurar el nivel de fucosilación de anticuerpo monoclonal y, a continuación, se titula de nuevo para afinar para lograr niveles críticos de fucosilación de anticuerpos monoclonales diana.

Esto es una ventaja única con la línea celular CHOK1 de inactivación del gen GMD y esta característica se describe únicamente en la presente divulgación.

Aunque la divulgación y la ejemplificación se han proporcionado a modo de ilustraciones y ejemplos con el propósito de claridad y comprensión, es evidente para un experto en la materia que pueden practicarse diversos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la divulgación. Por consiguiente, las descripciones y ejemplos anteriores no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente divulgación.

Se pretende que el alcance de la divulgación no esté limitado por la presente descripción detallada, sino más bien por las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que las siguientes reivindicaciones pretenden cubrir todas las características genéricas y específicas de la divulgación descrita en este documento.

Son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que la materia reivindicada puede practicarse de otra manera que la descrita específicamente. Cualquier referencia a elementos reivindicados en singular, por ejemplo, usando los artículos "uno", "una", "el", "la", o "dicho" no debe interpretarse como limitante de la divulgación.

A lo largo de la presente divulgación, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", donde se use, debe entenderse que implican la inclusión de un elemento indicado, un número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, un número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Cuando se indique un límite numérico o un intervalo en el presente documento, los puntos extremos se incluyen. Además, los valores y subintervalos dentro de un límite o intervalo numérico se incluyen específicamente como si se escribieran explícitamente.

Con respecto al uso de cualquier término plural y/o singular en la presente divulgación, los expertos en la materia pueden traducir del plural al singular y/o del singular al plural según se considere apropiado al contexto y/o la aplicación. Las diversas permutaciones singular/plural se pueden exponer expresamente en el presente documento por razones de claridad.

5 Cualquier tratamiento de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente con el propósito de proporcionar un contexto para la presente divulgación. No debe tomarse como una admisión que alguno o todos estos asuntos forman parte de la base de la técnica anterior o son de conocimiento general común en el campo relevante para la presente divulgación, como si existía en cualquier lugar antes de la fecha de prioridad de esta solicitud.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> ZUMUTOR BIOLOGICS, INC.
- <120> DOMINIO DE UNIÓN A ADN, PROTEÍNAS NO FUCOSILADAS Y PARCIALMENTE FUCOSILADAS Y MÉTODOS DE LAS MISMAS
- <130> IP30807
- 20 <140> 5767/CHE/2014
- <141> 15/11/2014
- <160> 102
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 3126
- <212> ADN
- 30 <213> Cricetulus griseus
- <220>
- <221> ARNm
- <222> (1)..(3126)
- 35 <223> ARNm de Fut8 de Cricetulus griseus
- <400> 1

caggttgctg	ctctggctta	ggccatctat	gaccctggtg	gtgttttcat	tcactataag	60
tccttcccat	ctttattaac	tgagcaagtt	cagctagtaa	ttttagagac	cgaggttcaa	120
gcaataacac	ctatctctgc	aataccgtgt	ggctttcttc	aatgtcttac	atcctaagga	180
aaggaagcat	gtagagccca	ggaagcacag	gacaagaaag	ctgcctcctt	gtatcaccag	240
gaagatcttt	ttgtaagagt	catcacagta	taccagagag	actaattttg	tctgaagcat	300
catgtgttga	aacaacagaa	acttattttc	ctgtgtggct	aactagaacc	agagtacaat	360
gtttccaatt	ctttgagctc	cgagaagaca	gaagggagtt	gaaactctga	aaatgcgggc	420
atggactggt	tcttggcggt	ggattatgct	cattcttttt	gcctggggga	ccttattggt	480
ttatataggt	ggtcatttgg	ttcgagataa	tgaccaccct	gaccattcta	gcagagaact	540
ctccaagatt	cttgcaaagc	tggagcgctt	aaaacaacaa	aatgaagact	tgaggagaat	600
ggctgagtct	ctccgaatac	cagaaggccc	tattgatcag	gggacagcta	caggaagagt	660
ccgtgtttta	gaagaacagc	ttgttaaggc	caaagaacag	attgaaaatt	acaagaaaca	720
agctaggaat	gatctgggaa	aggatcatga	aatcttaagg	aggaggattg	aaaatggagc	780
taaagagctc	tggttttttc	tacaaagtga	attgaagaaa	ttaaagaaat	tagaaggaaa	840
cgaactccaa	agacatgcag	atgaaattct	tttggattta	ggacatcatg	aaaggtctat	900
catgacagat	ctatactacc	tcagtcaaac	agatggagca	ggtgagtggc	gggaaaaaga	960
agccaaagat	ctgacagagc	tgggtccagcg	gagaataaca	tatctgcaga	atcccaagga	1020
ctgcagcaaa	gccagaaagc	tgggatgtaa	tatcaacaaa	ggctgtggct	atggatgtca	1080

ES 2 712 303 T3

actccatcat gtggtttact gtttcatgat tgcttatggc acccagcga cactcatctt 1140  
 ggaatctcag aattggcgct atgctactgg aggatgggag actgtgttta gacctgtaag 1200  
 tgagacatgc acagacaggt ctggcctctc cactggacac tggtcaggtg aagtgaagga 1260  
 caaaaatgtt caagtggtcg agctcccat tgtagacagc ctccatcctc gtcctcctta 1320  
 cttacccttg gctgtaccag aagaccttgc agatcgactc ctgagagtcc atgggtgatcc 1380  
 tgcagtgtgg tgggtatccc agtttgtcaa atacttgatc cgtccacaac cttggctgga 1440  
 aagggaaata gaagaaacca ccaagaagct tggcttcaaa catccagtta ttggagtcca 1500  
 tgtcagacgc actgacaaaag tgggaacaga agcagccttc catcccattg aggaatacat 1560  
 ggtacacggt gaagaacatt ttcagcttct cgaacgcaga atgaaagtgg ataaaaaag 1620  
 agtgtatctg gccactgatg acccttcttt gttaaaggag gcaaagacaa agtactccaa 1680  
 ttatgaattt attagtgata actctatctt ttggtcagct ggactacaca accgatacac 1740  
 agaaaattca cttcggggcg tgatcctgga tatacacttt ctctcccagg ctgacttctt 1800  
 tgtgtgtact ttttcatccc aggtctgtag gtttcttat gaaatcatgc aaactgca 1860  
 tcctgatgcc tctgcaaact tccattcttt agatgacatc tactatcttg gaggcaaaa 1920  
 tgcccacaac cagattgcag tttatcctca ccaacctoga actaaagagg aaatccccat 1980  
 ggaacctgga gatatcattg gtgtggctgg aaaccttgg aatggttact ctaaagggtg 2040  
 caacagaaaa ctaggaaaa caggcctgta cccttctac aaagtccgag agaagataga 2100  
 aacagtcaaa taccctacat atcctgaagc tgaaaaatag agatggagtg taagagatta 2160  
 acaacagaat ttagttcaga ccatctcagc caagcagaag acccagacta acatatggtt 2220  
 cattgacaga catgctccgc accaagagca agtgggaacc ctgagatgct gcaactggtg 2280  
 aacgcctctt tgtgaagggc tgctgtgccc tcaagcccat gcacagtaa ataatgtact 2340  
 cacacataac atacaaatgg attatcttct actttgcctt ttaaatttc tgtccccatg 2400  
 aaacaaacac tgccacatta tgtaatttaa gtgacacaga cgttttgtgt gagacttcaa 2460  
 acatggtgcc tatatctgag agacctctgt gatttactga gaagatgaga acagctccct 2520  
 tctgtgggga agttggttct tagtcagtgg tggactggcc actgaattca ctgcaatcaa 2580  
 cagattcaga atgagaatgg atgttttcc tttatatggt tgtctggatt ttttttaaag 2640  
 taatttcatc agttcagttc atccacctca ttaataaatg aaggaatata ccaataaaat 2700  
 caaatgaaat attcactgtc cattaggaag tttataaaa caatgccatg aacaaaaaat 2760  
 tcttttagtac tcaatgtttc tggacattct ctttgataac aaaaataaat tttaaaaagg 2820  
 aattttgtaa agtttctggg attctgtatc actggatgat gtagttataa gctttgtagt 2880  
 agaaatagtg gaagtgggtt tatagctttt aagatttttt tctacttttg tcctactttt 2940

ES 2 712 303 T3

	tctatctctg atagaataat catatctca gagaagcatt ggtcccctct aatactagta	3000
	actgccttta gtcacgcata ttatatgaag ttgctaagaa cacgctttgg gggaggtggt	3060
	cactctctta gtttgatatt gttgacttga tataattgaa tgaaatagtc attctcttgc	3120
	ttccag	3126
	<210> 2	
	<211> 1360	
5	<212> ADN	
	<213> Cricetulus griseus	
	<220>	
	<221> ARNm	
10	<222> (1)..(1360)	
	<223> ARNm de GMD de Cricetulus griseus	
	<400> 2	
	ccaggatggc tcatacttgg cagaattcct gctggagaaa ggatacagagg ttcatggaat	60
	tgtacggcga tccagttcat ttaatacagg tcgaattgaa catttatata agaatccaca	120
	ggctcatatt gaaggaaaca tgaagttgca ctatggtgac ctcaccgaca gcacctgcct	180
	agtaaaaatc atcaatgaag tcaaacctac agagatctac aatcttgggtg cccagagcca	240
	tgtcaagatt tcctttgact tagcagagta cactgcagat gttgatggag ttggcacctt	300
	gcggtctctg gatgcaatta agacttgtgg ccttataaat tctgtgaagt tctaccaggc	360
	ctcaactagt gaactgtatg gaaaagtgca agaaatacc cagaaagaga ccaccctttt	420
	ctatccaagg tcgccctatg gagcagccaa actttatgcc tattggattg tagtgaactt	480
	tcgagaggct tataatctct ttgcggtgaa cggcattctc ttcaatcatg agagtcctag	540
	aagaggagct aatcttggtt ctcgaaaaat tagccggtca gtagctaaga tttaccttgg	600
	acaactggaa tgcttcagtt tgggaaatct ggacgcaaaa cgagactggg gccatgcaaa	660
	ggactatgtc gaggctatgt ggctgatgtt acaaaatgat gaaccagagg actttgtcat	720
	agctactggg gaagttcata gtgtccgtga atttgttgag aatcattca tgcacattgg	780
	aaagaccatt gtgtgggaag gaaagaatga aatgaagtg ggcagatgta aagagaccgg	840
	caaaattcat gtgactgtgg atctgaaata ctaccgacca actgaagtgg acttcctgca	900
	gggagactgc tccaaggcgc agcagaaact gaactggaag ccccgcggtg cctttgacga	960
	gctggtgagg gagatggtgc aagccgatgt ggagctcatg agaaccaacc ccaacgcctg	1020
	agcacctcta caaaaaattc gcgagacatg gactatggtg cagagccagc caaccagagt	1080
	ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg cctgtgtcgt cccacagct	1140
	aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac actccagagc taaggccact	1200
15	tcgcttttgt caaaggctcc tctgaatgat tttgggaaat caagaagttt aaaatcacat	1260

ES 2 712 303 T3

	actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaa	1320
	tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaaccagca	1360
5	<210> 3 <211> 4101 <212> ADN <213> Streptococcus pyogenes	
10	<220> <221> gen <222> (1)..(4101) <223> Secuencia de nucleótidos de Cas9	
	<400> 3	
	gacaagaagt acagcatcgg cctggacatc ggcaccaact ctgtgggctg ggccgtgatc	60
	accgacgagt acaaggtgcc cagcaagaaa ttcaaggtgc tgggcaacac cgaccggcac	120
	agcatcaaga agaacctgat cggagccctg ctgttcgaca gcggcgaaac agccgaggcc	180
	acccggctga agagaaccgc cagaagaaga tacaccagac ggaagaaccg gatctgctat	240
	ctgcaagaga tcttcagcaa cgagatggcc aaggtggacg acagcttctt ccacagactg	300
	gaagagtcct tcctggtgga agaggataag aagcacgagc ggcaccccat cttcggcaac	360
	atcgtggacg aggtggccta ccacgagaag taccacacca tctaccacct gagaaagaaa	420
	ctggtggaca gcaccgacaa ggccgacctg cggctgatct atctggccct ggcccacatg	480
	atcaagttcc gggggccactt cctgatcgag ggcgacctga accccgacaa cagcgacgtg	540
	gacaagctgt tcatccagct ggtgcagacc tacaaccagc tgttcgagga aaaccccatc	600
	aacgccagcg gcgtggacgc caaggccatc ctgtctgcca gactgagcaa gagcagacgg	660
	ctggaaaatc tgatcgccca gctgcccggc gagaagaaga atggcctgtt cggaaacctg	720
	attgccctga gcctgggcct gacccccaac ttcaagagca acttcgacct ggccgaggat	780
	gccaaactgc agctgagcaa ggacacctac gacgacgacc tggacaacct gctggcccag	840
	atcggcgacc agtacgccga cctgtttctg gccgccaaaga acctgtccga cgccatcctg	900
	ctgagcgaca tcctgagagt gaacaccgag atcaccaagg cccccctgag cgcctctatg	960
	atcaagagat acgacgagca ccaccaggac ctgaccctgc tgaaagctct cgtgcggcag	1020
	cagctgcctg agaagtacaa agagattttc ttcgaccaga gcaagaacgg ctacgccggc	1080
	tacattgacg gcggagccag ccaggaagag ttctacaagt tcatcaagcc catcctggaa	1140
	aagatggacg gcaccgagga actgctcgtg aagctgaaca gagaggacct gctgcggaag	1200
	cagcggacct tcgacaacgg cagcatcccc caccagatcc acctgggaga gctgcacgcc	1260
	attctgcggc ggcaggaaga tttttacca ttctgaagg acaaccggga aaagatcgag	1320
15	aagatcctga ccttccgcat ccctactac gtgggccctc tggccagggg aaacagcaga	1380

ES 2 712 303 T3

ttcgcctgga	tgaccagaaa	gagcgaggaa	accatcaccc	cctggaactt	cgaggaagtg	1440
gtggacaagg	gcgcttccgc	ccagagcttc	atcgagcggg	tgaccaactt	cgataagaac	1500
ctgcccacg	agaaggtgct	gcccaagcac	agcctgctgt	acgagtactt	caccgtgtat	1560
aacgagctga	ccaaagtgaa	atacgtgacc	gagggaaatga	gaaagcccgc	cttcctgagc	1620
ggcgagcaga	aaaaggccat	cgtggacctg	ctgttcaaga	ccaaccggaa	agtgaccgtg	1680
aagcagctga	aagaggacta	cttcaagaaa	atcgagtgtc	tcgactccgt	ggaaatctcc	1740
ggcgtggaag	atcggttcaa	cgctccctg	ggcacatacc	acgatctgct	gaaaattatc	1800
aaggacaagg	acttcctgga	caatgaggaa	aacgaggaca	ttctggaaga	tatcgtgctg	1860
accctgacac	tgtttgagga	cagagagatg	atcgaggaac	ggctgaaaac	ctatgccccac	1920
ctgttcgacg	acaaagtgat	gaagcagctg	aagcggcggg	gatacaccgg	ctggggcagg	1980
ctgagccgga	agctgatcaa	cggcatccgg	gacaagcagt	ccggcaagac	aatcctggat	2040
ttcctgaagt	ccgacggctt	cgccaacaga	aacttcatgc	agctgatcca	cgacgacagc	2100
ctgaccttta	aagaggacat	ccagaaagcc	caggtgtccg	gccagggcga	tagcctgcac	2160
gagcacattg	ccaatctggc	cggcagcccc	gccattaaga	agggcatcct	gcagacagtg	2220
aaggtggtgg	acgagctcgt	gaaagtgatg	ggccggcaca	agcccgagaa	catcgtgatc	2280
gaaatggcca	gagagaacca	gaccaccag	aagggacaga	agaacagccg	cgagagaatg	2340
aagcggatcg	aagagggcat	caaagagctg	ggcagccaga	tcctgaaaga	acaccccgtg	2400
gaaaacaccc	agctgcagaa	cgagaagctg	tacctgtact	acctgcagaa	tgggcgggat	2460
atgtacgtgg	accaggaact	ggacatcaac	cggtgtccg	actacgatgt	ggaccatata	2520
gtgcctcaga	gctttctgaa	ggacgactcc	atcgacaaca	aggtgctgac	cagaagcgac	2580
aagaaccggg	gcaagagcga	caactgtccc	tccgaagagg	tcgtgaagaa	gatgaagaac	2640
tactggcggc	agctgctgaa	cgccaagctg	attaccaga	gaaagttcga	caatctgacc	2700
aaggccgaga	gaggcggcct	gagcgaactg	gataaggccg	gcttcatcaa	gagacagctg	2760
gtggaaaccc	ggcagatcac	aaagcacgtg	gcacagatcc	tggactcccg	gatgaacact	2820
aagtacgacg	agaatgacaa	gctgatccgg	gaagtgaaag	tgatcacctt	gaagtccaag	2880
ctggtgtccg	atctccggaa	ggatttccag	ttttacaaag	tgcgcgagat	caacaactac	2940
caccacgccc	acgacgccta	cctgaacgcc	gtcgtgggaa	ccgccctgat	caaaaagtac	3000
cctaagctgg	aaagcgagtt	cgtgtacggc	gactacaagg	tgtacgacgt	gcggaagatg	3060
atcgccaaga	gcgagcagga	aatcggcaag	gctaccgcca	agtacttctt	ctacagcaac	3120
atcatgaact	ttttcaagac	cgagattacc	ctggccaacg	gcgagatccg	gaagcggcct	3180
ctgatcgaga	caaacggcga	aaccggggag	atcgtgtggg	ataagggccg	ggattttgcc	3240
accgtgcgga	aagtgtgag	catgccccaa	gtgaatatcg	tgaaaaagac	cgaggtgcag	3300

ES 2 712 303 T3

acagggcggct tcagcaaaga gtctatcctg cccaagagga acagcgataa gctgatcgcc 3360  
 agaaagaagg actgggaccc taagaagtac ggcggcttcg acagccccac cgtggcctat 3420  
 tctgtgctgg tgggtggccaa agtggaaaag ggcaagtcca agaaactgaa gagtgtgaaa 3480  
 gagctgctgg ggatcacccat catggaaaga agcagcttcg agaagaatcc catcgacttt 3540  
 ctggaagcca agggctacaa agaagtgaaa aaggacctga tcatcaagct gcctaagtac 3600  
 tcctgtttcg agctggaaaa cggccggaag agaatgctgg cctctgccgg cgaactgcag 3660  
 aagggaaaacg aactggccct gccctccaaa tatgtgaact tcctgtacct ggccagccac 3720  
 tatgagaagc tgaagggtc ccccgaggat aatgagcaga aacagctgtt tgtggaacag 3780  
 cacaagcact acctggacga gatcatcgag cagatcagcg agttctcaa gagagtgatc 3840  
 ctggccgacg ctaatctgga caaagtgctg tccgcctaca acaagcaccg ggataagccc 3900  
 atcagagagc aggccgagaa tatcatccac ctgtttaccc tgaccaatct gggagcccct 3960  
 gccgccttca agtactttga caccaccatc gaccggaaga ggtacaccag caccaaagag 4020  
 gtgctggacg ccaccctgat ccaccagagc atcaccggcc tgtacgagac acggatcgac 4080  
 ctgtctcagc tgggagggca c 4101

<210> 4  
 <211> 1367  
 <212> PRT  
 <213> Streptococcus pyogenes

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(1367)  
 <223> Secuencia de aminoácidos de Cas9

<400> 4

Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys  
 20 25 30

Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly  
 35 40 45

Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys  
 50 55 60

Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr  
 65 70 75 80

5

10

15

ES 2 712 303 T3

Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe  
85 90 95

Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His  
100 105 110

Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His  
115 120 125

Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser  
130 135 140

Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met  
145 150 155 160

Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp  
165 170 175

Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn  
180 185 190

Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys  
195 200 205

Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu  
210 215 220

Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu  
225 230 235 240

Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp  
245 250 255

Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp  
260 265 270

Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu  
275 280 285

Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile  
290 295 300

Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met  
305 310 315 320

Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala  
325 330 335

ES 2 712 303 T3

Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp  
 340 345 350

Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln  
 355 360 365

Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly  
 370 375 380

Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys  
 385 390 395 400

Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly  
 405 410 415

Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu  
 420 425 430

Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro  
 435 440 445

Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met  
 450 455 460

Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val  
 465 470 475 480

Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn  
 485 490 495

Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu  
 500 505 510

Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr  
 515 520 525

Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys  
 530 535 540

Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr Val  
 545 550 555 560

Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser  
 565 570 575

Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr  
 580 585 590

ES 2 712 303 T3

Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn  
 595 600 605

Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu  
 610 615 620

Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His  
 625 630 635 640

Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr  
 645 650 655

Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys  
 660 665 670

Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala  
 675 680 685

Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys  
 690 695 700

Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu His  
 705 710 715 720

Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile  
 725 730 735

Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly Arg  
 740 745 750

His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr  
 755 760 765

Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu  
 770 775 780

Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro Val  
 785 790 795 800

Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln  
 805 810 815

Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg Leu  
 820 825 830

Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp



ES 2 712 303 T3

Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu  
 1085 1090 1095  
  
 Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg  
 1100 1105 1110  
  
 Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys  
 1115 1120 1125  
  
 Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu  
 1130 1135 1140  
  
 Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser  
 1145 1150 1155  
  
 Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe  
 1160 1165 1170  
  
 Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu  
 1175 1180 1185  
  
 Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe  
 1190 1195 1200  
  
 Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu  
 1205 1210 1215  
  
 Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn  
 1220 1225 1230  
  
 Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro  
 1235 1240 1245  
  
 Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His  
 1250 1255 1260  
  
 Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg  
 1265 1270 1275  
  
 Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr  
 1280 1285 1290  
  
 Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile  
 1295 1300 1305  
  
 Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe  
 1310 1315 1320

ES 2 712 303 T3

Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr  
 1325 1330 1335

Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly  
 1340 1345 1350

Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
 1355 1360 1365

<210> 5  
 <211> 4101  
 <212> ADN  
 <213> Streptococcus pyogenes

<220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(4101)  
 <223> Secuencia de nucleótidos de Cas9n

<400> 5

gacaagaagt acagcatcgg cctggccatc ggaccaact ctgtgggctg ggccgtgatc 60  
 accgacgagt acaaggtgcc cagcaagaaa ttcaaggtgc tgggcaacac cgaccggcac 120  
 agcatcaaga agaacctgat cggagccctg ctgttcgaca gggcgaaac agccgaggcc 180  
 acccggtga agagaaccgc cagaagaaga tacaccagac ggaagaaccg gatctgctat 240  
 ctgcaagaga tcttcagcaa cgagatggcc aaggtggacg acagcttctt ccacagactg 300  
 gaagatcct tcctggtgga agaggataag aagcacgagc ggcaacccat cttcggcaac 360  
 atcgtggacg aggtggccta ccacgagaag taccacacca tctaccacct gagaaagaaa 420  
 ctggtggaca gcaccgacaa ggccgacctg cggctgatct atctggccct ggcccacatg 480  
 atcaagttcc ggggccactt cctgatcgag ggcgacctga accccgacaa cagcgacgtg 540  
 gacaagctgt tcatccagct ggtgcagacc tacaaccagc tgttcgagga aaaccccatc 600  
 aacgccagcg gcgtggacgc caaggccatc ctgtctgcca gactgagcaa gagcagacgg 660  
 ctggaaaatc tgatcgccca gctgcccggc gagaagaaga atggcctgtt cggaaacctg 720  
 attgccctga gcctgggcct gacccccaac ttcaagagca acttcgacct ggccgaggat 780  
 gccaaactgc agctgagcaa ggacacctac gacgacgacc tggacaacct gctggcccag 840  
 atcggcgacc agtacgccga cctgtttctg gccgccaaga acctgtccga cgccatcctg 900  
 ctgagcgaca tcctgagagt gaacaccgag atcaccaagg ccccctgag cgcctctatg 960  
 atcaagagat acgacgagca ccaccaggac ctgaccctgc tgaaagctct cgtgcggcag 1020  
 cagctgcctg agaagtacaa agagatthttc ttcgaccaga gcaagaacgg ctacgccggc 1080  
 tacattgacg gcggagccag ccaggaagag ttctacaagt tcatcaagcc catcctggaa 1140

15

ES 2 712 303 T3

aagatggacg gcaccgagga actgctcgtg aagctgaaca gagaggacct gctgcggaag 1200  
cagcggacct tcgacaacgg cagcatcccc caccagatcc acctgggaga gctgcacgcc 1260  
attctgcggc ggcaggaaga tttttacca ttctgaagg acaaccggga aaagatcgag 1320  
aagatcctga ccttccgcat cccctactac gtgggccctc tggccagggg aaacagcaga 1380  
ttcgctgga tgaccagaaa gagcgaggaa accatcacc cctggaactt cgaggaagtg 1440  
gtggacaagg gcgcttccgc ccagagcttc atcgagcggg tgaccaactt cgataagaac 1500  
ctgcccacag agaaggtgct gcccaagcac agcctgctgt acgagtactt caccgtgtat 1560  
aacgagctga ccaaagtga atacgtgacc gagggaatga gaaagccgc cttcctgagc 1620  
ggcgagcaga aaaaggccat cgtggacctg ctgttcaaga ccaaccggaa agtgaccgtg 1680  
aagcagctga aagaggacta cttcaagaaa atcgagtgtc tcgactccgt ggaaatctcc 1740  
ggcgtggaag atcggttaa cgcctccctg ggcacatacc acgatctgct gaaaattatc 1800  
aaggacaagg acttctgga caatgaggaa aacgaggaca ttctggaaga tatcgtgctg 1860  
accctgacac tgtttgagga cagagagatg atcgaggaac ggctgaaaac ctatgccac 1920  
ctgttcgacg acaaagtgat gaagcagctg aagcggcggg gatacaccgg ctggggcagg 1980  
ctgagccgga agctgatcaa cggcatccgg gacaagcagt ccggcaagac aatcctggat 2040  
ttctgaagt ccgacggctt cgccaacaga aacttcatgc agctgatcca cgacgacagc 2100  
ctgacctta aagaggacat ccagaaagcc caggtgtccg gccagggcga tagcctgcac 2160  
gagcacattg ccaatctggc cggcagcccc gccattaaga agggcatcct gcagacagtg 2220  
aagtggtgg acgagctcgt gaaagtgatg ggccggcaca agcccagaaa catcgtgatc 2280  
gaaatggcca gagagaacca gaccaccag aaggacaga agaacagccg cgagagaatg 2340  
aagcggatcg aagagggcat caaagagctg ggcagccaga tcctgaaaga acacccctg 2400  
gaaaacaccc agctgcagaa cgagaagctg tacctgtact acctgcagaa tgggcgggat 2460  
atgtacgtgg accaggaact ggacatcaac cggctgtccg actacgatgt ggaccatata 2520  
gtgcctcaga gctttctgaa ggacgactcc atcgacaaca aggtgctgac cagaagcgac 2580  
aagaaccggg gcaagagcga caacgtgcc tccgaagagg tcgtgaagaa gatgaagaac 2640  
tactggcggc agctgctgaa cgccaagctg attacccaga gaaagttoga caatctgacc 2700  
aagggcggaga gagggcggcct gagcgaactg gataaggccg gtttcatcaa gagacagctg 2760  
gtggaaaccc ggcagatcac aaagcacgtg gcacagatcc tggactcccg gatgaacact 2820  
aagtacgacg agaatgacaa gctgatccgg gaagtgaag tgatcacctt gaagtccaag 2880  
ctggtgtccg atttccggaa ggatttccag ttttaciaag tgccgagat caacaactac 2940  
caccacgccc acgacgccta cctgaacgcc gtcgtgggaa ccgccctgat caaaaagtac 3000  
cctaagctgg aaagcgagtt cgtgtacggc gactacaagg tgtacgacgt gcggaagatg 3060

ES 2 712 303 T3

atcgccaaga gcgagcagga aatcggcaag gctaccgcca agtacttctt ctacagcaac 3120  
atcatgaact ttttcaagac cgagattacc ctggccaacg gcgagatccg gaagcggcct 3180  
ctgatcgaga caaacggcga aaccggggag atcgtgtggg ataagggccg ggattttgcc 3240  
accgtgcgga aagtgctgag catgccccaa gtgaatatcg tgaaaaagac cgaggtgcag 3300  
acagggcggt tcagcaaaga gtctatcctg cccaagagga acagcgataa gctgatcgcc 3360  
agaaagaagg actgggacct taagaagtac ggcggcttcg acagccccac cgtggcctat 3420  
tctgtgctgg tgggtggccaa agtggaaaag ggcaagtcca agaaactgaa gagtgtgaaa 3480  
gagctgctgg ggatcaccat catggaaaga agcagcttcg agaagaatcc catcgacttt 3540  
ctggaagcca agggctacaa agaagtgaaa aaggacctga tcatcaagct gcctaagtac 3600  
tccctgttcg agctggaaaa cggccggaag agaatgctgg cctctgccgg cgaactgcag 3660  
aagggaaacg aactggccct gccctccaaa tatgtgaact tcctgtacct ggccagccac 3720  
tatgagaagc tgaagggctc ccccgaggat aatgagcaga aacagctgtt tgtggaacag 3780  
cacaagcact acctggacga gatcatcgag cagatcagcg agttctccaa gagagtgatc 3840  
ctggccgacg ctaatctgga caaagtgctg tccgcctaca acaagcaccg ggataagccc 3900  
atcagagagc agggcgagaa tatcatccac ctgtttaccc tgaccaatct gggagcccct 3960  
gccgccttca agtactttga caccaccatc gaccggaaga ggtacaccag caccaaagag 4020  
gtgctggacg ccaccctgat ccaccagagc atcaccggcc tgtacgagac acggatcgac 4080  
ctgtctcagc tgggagggca c 4101

<210> 6  
<211> 1367  
5 <212> PRT  
<213> Streptococcus pyogenes

<220>  
10 <221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(1367)  
<223> Secuencia de aminoácidos de Cas9n

<400> 6

Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly  
1 5 10 15

Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys  
20 25 30

Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly  
15 35 40 45

ES 2 712 303 T3

Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys  
50 55 60

Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe  
85 90 95

Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His  
100 105 110

Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His  
115 120 125

Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser  
130 135 140

Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met  
145 150 155 160

Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp  
165 170 175

Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn  
180 185 190

Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys  
195 200 205

Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu  
210 215 220

Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu  
225 230 235 240

Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp  
245 250 255

Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp  
260 265 270

Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu  
275 280 285

Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile  
290 295 300

ES 2 712 303 T3

Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met  
 305 310 315 320

Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala  
 325 330 335

Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp  
 340 345 350

Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln  
 355 360 365

Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly  
 370 375 380

Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys  
 385 390 395 400

Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly  
 405 410 415

Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu  
 420 425 430

Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro  
 435 440 445

Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met  
 450 455 460

Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val  
 465 470 475 480

Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn  
 485 490 495

Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu  
 500 505 510

Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr  
 515 520 525

Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys  
 530 535 540

Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr Val  
 545 550 555 560

ES 2 712 303 T3

Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser  
 565 570 575

Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr  
 580 585 590

Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn  
 595 600 605

Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu  
 610 615 620

Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His  
 625 630 635 640

Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr  
 645 650 655

Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys  
 660 665 670

Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala  
 675 680 685

Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys  
 690 695 700

Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu His  
 705 710 715 720

Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile  
 725 730 735

Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly Arg  
 740 745 750

His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr  
 755 760 765

Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu  
 770 775 780

Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro Val  
 785 790 795 800

Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln

ES 2 712 303 T3

				805						810						815
Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Arg	Leu	
			820					825					830			
Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Lys	Asp	
		835					840					845				
Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Arg	Gly	
	850					855					860					
Lys	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Glu	Val	Val	Lys	Lys	Met	Lys	Asn	
865					870					875					880	
Tyr	Trp	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Lys	Leu	Ile	Thr	Gln	Arg	Lys	Phe	
				885					890					895		
Asp	Asn	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Gly	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	Asp	Lys	
			900					905					910			
Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Arg	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Gln	Ile	Thr	Lys	
		915					920					925				
His	Val	Ala	Gln	Ile	Leu	Asp	Ser	Arg	Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asp	Glu	
	930					935					940					
Asn	Asp	Lys	Leu	Ile	Arg	Glu	Val	Lys	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Ser	Lys	
945					950					955					960	
Leu	Val	Ser	Asp	Phe	Arg	Lys	Asp	Phe	Gln	Phe	Tyr	Lys	Val	Arg	Glu	
				965					970					975		
Ile	Asn	Asn	Tyr	His	His	Ala	His	Asp	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ala	Val	Val	
			980					985					990			
Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Lys	Tyr	Pro	Lys	Leu	Glu	Ser	Glu	Phe	Val	
		995					1000					1005				
Tyr	Gly	Asp	Tyr	Lys	Val	Tyr	Asp	Val	Arg	Lys	Met	Ile	Ala	Lys		
	1010					1015					1020					
Ser	Glu	Gln	Glu	Ile	Gly	Lys	Ala	Thr	Ala	Lys	Tyr	Phe	Phe	Tyr		
	1025					1030					1035					
Ser	Asn	Ile	Met	Asn	Phe	Phe	Lys	Thr	Glu	Ile	Thr	Leu	Ala	Asn		
	1040					1045					1050					

ES 2 712 303 T3

Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr  
 1055 1060 1065

Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg  
 1070 1075 1080

Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu  
 1085 1090 1095

Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg  
 1100 1105 1110

Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys  
 1115 1120 1125

Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu  
 1130 1135 1140

Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser  
 1145 1150 1155

Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe  
 1160 1165 1170

Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu  
 1175 1180 1185

Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe  
 1190 1195 1200

Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu  
 1205 1210 1215

Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn  
 1220 1225 1230

Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro  
 1235 1240 1245

Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His  
 1250 1255 1260

Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg  
 1265 1270 1275

Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr  
 1280 1285 1290

ES 2 712 303 T3

Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile  
 1295 1300 1305

Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe  
 1310 1315 1320

Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr  
 1325 1330 1335

Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly  
 1340 1345 1350

Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
 1355 1360 1365

5 <210> 7  
 <211> 238  
 <212> ADN  
 <213> Cricetulus griseus

10 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(238)  
 <223> Secuencia de nucleótidos del exón 7 de Fut8

<400> 7

aatcccaagg actgcagcaa agccagaaaag ctggtatgta atatcaacaa aggctgtggc 60  
 tatggatgtc aactccatca tgtggtttac tgcttcatga ttgcttatgg caccagcgga 120  
 aactcatct tggaaatctca gaattggcgc tatgctactg gaggatggga gactgtgttt 180  
 15 agacctgtaa gtgagacatg cacagacagg tctggcctct cactggaca ctggtcag 238

20 <210> 8  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> Cricetulus griseus

25 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(79)  
 <223> Secuencia de aminoácidos del exón 7 de Fut8

<400> 8

Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn  
 1 5 10 15

Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu His His Val Val Tyr Cys Phe  
 20 25 30

30

ES 2 712 303 T3

Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn  
 35 40 45

Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu Thr Val Phe Arg Pro Val Ser  
 50 55 60

Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu Ser Thr Gly His Trp Ser  
 65 70 75

5 <210> 9  
 <211> 110  
 <212> ADN  
 <213> Cricetulus griseus

10 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(110)  
 <223> Secuencia de nucleótidos del exón 3 de GMD

<400> 9

15 acatgaagtt gcactatggt gacctcaccg acagcacctg cctagtaaaa atcatcaatg 60  
 aagtcaaacc tacagagatc tacaatcttg gtgccagag ccatgtcaag 110

20 <210> 10  
 <211> 193  
 <212> ADN  
 <213> Cricetulus griseus

25 <220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(193)  
 <223> Secuencia de nucleótidos del exón 4 de GMD

<400> 10

30 atttcctttg acttagcaga gtacactgca gatggtgatg gagttggcac cttgaggctt 60  
 ctggatgcaa ttaagacttg tggccttata aattctgtga agttctacca ggcctcaact 120  
 agtgaactgt atggaaaagt gcaagaaata cccagaaag agaccacccc tttctatcca 180  
 aggtcgccct atg 193

35 <210> 11  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Cricetulus griseus

40 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(36)  
 <223> Secuencia de aminoácidos del exón 3 de GMD

<400> 11

ES 2 712 303 T3

Met Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys  
 1 5 10 15

Ile Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln  
 20 25 30

Ser His Val Lys  
 35

5 <210> 12  
 <211> 64  
 <212> PRT  
 <213> Cricetulus griseus

10 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(64)  
 <223> Secuencia de aminoácidos del exón 4 de GMD

<400> 12

Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp Gly Val Gly  
 1 5 10 15

Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu Ile Asn Ser  
 20 25 30

Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly Lys Val Gln  
 35 40 45

15 Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg Ser Pro Tyr  
 50 55 60

20 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 1 de CRISPR

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(23)

30 <400> 13  
 aattggcgct atgctactgg agg

23

35 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ARNm de secuencia de reconocimiento 1 de CRISPR

40 <220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 712 303 T3

	<222> (1)..(23)	
	<400> 14 aauuggcgcu augcuacugg agg	23
5	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de reconocimiento 2 de CRISPR	
15	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(23)	
20	<400> 15 ccagcgaaca ctcattcttg aat	23
25	<210> 16 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNm de secuencia de reconocimiento 2 de CRISPR	
35	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(23)	
40	<400> 16 ccagcgaaca cucaucuugg aau	23
45	<210> 17 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia de reconocimiento 3 de CRISPR	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(56)	
60	<400> 17 tgaccacct gaccattcta gcagagaact ctccaagatt cttgcaaagc tggagc	56
65	<210> 18 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de reconocimiento 4 de CRISPR	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(59)	
	<400> 18 tctccaagat tcttgcaaag ctggagcgct taaaacaaca aatgaagac ttgaggaga	59

ES 2 712 303 T3

<210> 19  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 5 de CRISPR  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(45)  
 <400> 19  
 15 **aggccaaaga acagattgaa aattacaaga aacaagctag gaatg** 45  
 <210> 20  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 6 de CRISPR  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(56)  
 <400> 20  
 30 **aatcccaagg actgcagcaa agccagaaag ctggtatgta atatcaaca aggctg** 56  
 <210> 21  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 7 de CRISPR  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(58)  
 <400> 21  
 45 **gcacccagcg aacactcatc ttggaatctc agaattggcg ctatgctact ggaggatg** 58  
 <210> 22  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 8 de CRISPR  
 <220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(57)  
 <400> 22  
 60 **agacctgtaa gtgagacatg cacagacagg tctggcctct cactggaca ctggtca** 57  
 <210> 23  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65

ES 2 712 303 T3

<220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 9 de CRISPR

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(57)

<400> 23  
 caccagcga aactcatct tggaatctca gaattggcgc tatgctactg gaggatg 57

10 <210> 24  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 10 de CRISPR

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(56)

<400> 24  
 ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca tggatga 56

25 <210> 25  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 11 de CRISPR

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(57)

<400> 25  
 gtaccagaag accttgca tgcactcctg agagtccatg gtgactcctgc agtgtgg 57

40 <210> 26  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 12 de CRISPR

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(56)

<400> 26  
 agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca tggatgactcct gcagtgtggg gggatg 56

55 <210> 27  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 13 de CRISPR

65 <220>  
 <221> misc\_feature

# ES 2 712 303 T3

	<222> (1)..(60)	
	<400> 27	
5	<b>gatccgtcca caaccttggc tggaaagga aatagaagaa accaccaaga agcttggctt</b>	<b>60</b>
	<210> 28	
	<211> 56	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 14 de CRISPR	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(56)	
	<400> 28	
20	<b>cgtccacaac cttggctgga aagggaata gaagaaacca ccaagaagct tggctt</b>	<b>56</b>
	<210> 29	
	<211> 59	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 15 de CRISPR	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(59)	
	<400> 29	
35	<b>catcctgatg cctctgcaaa cttccattct ttagatgaca tctactattt tggaggcca</b>	<b>59</b>
	<210> 30	
	<211> 56	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 16 de CRISPR	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(56)	
	<400> 30	
50	<b>catcctgatg cctctgcaaa cttccattct ttagatgaca tctactattt tggagg</b>	<b>56</b>
	<210> 31	
	<211> 59	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 17 de CRISPR	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(59)	
	<400> 31	
65	<b>caaccagatt gcagtttatc ctcaccaacc tcgaactaaa gaggaaatcc ccatggaac</b>	<b>59</b>

# ES 2 712 303 T3

5	<p>&lt;210&gt; 32          &lt;211&gt; 59          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Secuencia de reconocimiento 18 de CRISPR</p>	
10	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (1)..(59)</p>	
15	<p>&lt;400&gt; 32  <b>gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattgga atggttactc taaaggtgt</b></p>	59
20	<p>&lt;210&gt; 33          &lt;211&gt; 57          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Secuencia de reconocimiento 19 de CRISPR</p>	
25	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (1)..(57)</p>	
30	<p>&lt;400&gt; 33  <b>aaaccattgg aatggttact ctaaaggtgt caacagaaaa ctaggaaaa caggcct</b></p>	57
35	<p>&lt;210&gt; 34          &lt;211&gt; 58          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Secuencia de reconocimiento 20 de CRISPR</p>	
40	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (1)..(58)</p>	
45	<p>&lt;400&gt; 34  <b>caacctcgaa ctaaagagga aatcccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctg</b></p>	58
50	<p>&lt;210&gt; 35          &lt;211&gt; 57          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Secuencia de reconocimiento 21 de CRISPR</p>	
55	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (1)..(57)</p>	
60	<p>&lt;400&gt; 35  <b>tcaccaacct cgaactaaag aggaaatccc catggaacct ggagatatca ttggtgt</b></p>	57
65	<p>&lt;210&gt; 36          &lt;211&gt; 56          &lt;212&gt; ADN          &lt;213&gt; Secuencia artificial</p>	

# ES 2 712 303 T3

	<220>		
	<223>	Secuencia de reconocimiento de CRISPR	
	<220>		
5	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(56)	
	<400>	36	
10		<b>atcccccattgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggaa tggtta</b>	<b>56</b>
	<210>	37	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de reconocimiento 22 de CRISPR	
	<220>		
20	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(20)	
	<400>	37	
25		<b>attccaagat gagtgttcgc</b>	<b>20</b>
	<210>	38	
	<211>	20	
	<212>	ARN	
30	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	ARNm de secuencia de reconocimiento 3 de CRISPR	
	<220>		
35	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(20)	
	<400>	38	
40		<b>auuccaagau gaguguucgc</b>	<b>20</b>
	<210>	39	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
45	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de reconocimiento 23 de CRISPR	
	<220>		
50	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(20)	
	<400>	39	
55		<b>aattggcgct atgctactgg</b>	<b>20</b>
	<210>	40	
	<211>	20	
	<212>	ARN	
60	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	ARNm de secuencia de reconocimiento 4 de CRISPR	
	<220>		
65	<221>	misc_feature	

	<222> (1)..(20)	
	<400> 40	
5	<b>aaugggcgcu augcuacugg</b>	20
	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 24 de CRISPR	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 41	
20	<b>actaggcagg tgctgtcgg</b>	20
	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNm de secuencia de reconocimiento 5 de CRISPR	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 42	
35	<b>acuaggcagg ugcugucggu</b>	20
	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 25 de CRISPR	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 43	
50	<b>catcaatgaa gtcaaaccta</b>	20
	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> ARN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNm de secuencia de reconocimiento 6 de CRISPR	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 44	
65	<b>caucaaugaa gucaaaccua</b>	20

ES 2 712 303 T3

<210> 45  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 26 de CRISPR  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)  
 <400> 45  
 15 **agttggcacc ttgcggcttc** 20  
 <210> 46  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> ARNm de secuencia de reconocimiento 7 de CRISPR  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)  
 <400> 46  
 30 **aguuggcacc uugcggcuuc** 20  
 <210> 47  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 27 de CRISPR  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(58)  
 <400> 47  
 45 **gacctcaccg acagcacctg cctagtaaaa atcatcaatg aagtcaaacc tacagaga** 58  
 <210> 48  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 28 de CRISPR  
 <220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(60)  
 <400> 48  
 60 **gacctcaccg acagcacctg cctagtaaaa atcatcaatg aagtcaaacc tacagagatc** 60  
 <210> 49  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65

# ES 2 712 303 T3

	<220>		
	<223>	Secuencia de reconocimiento 29 de CRISPR	
5	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(56)	
	<400>	49	
10		gcactatggt gacctcaccg acagcacctg cctagtaaaa atcatcaatg aagtca	56
	<210>	50	
	<211>	57	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Secuencia de reconocimiento 31 de CRISPR	
20	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(57)	
	<400>	50	
25		cttctggatg caattaagac ttgtggcctt ataaattctg tgaagttcta ccaggcc	57
	<210>	51	
	<211>	58	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	Secuencia de reconocimiento 32 de CRISPR	
35	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(58)	
	<400>	51	
40		cttctggatg caattaagac ttgtggcctt ataaattctg tgaagttcta ccaggcct	58
	<210>	52	
	<211>	58	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	Secuencia de reconocimiento 33 de CRISPR	
50	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(58)	
	<400>	52	
55		caccttgccg cttctggatg caattaagac ttgtggcctt ataaattctg tgaagttc	58
	<210>	53	
	<211>	56	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
60	<220>		
	<223>	Secuencia de reconocimiento 34 de CRISPR	
65	<220>		
	<221>	misc_feature	

ES 2 712 303 T3

	<222> (1)..(56)	
	<400> 53	
5	<b>ggccttataa attctgtgaa gttctaccag gcctcaacta gtgaactgta tggaaa</b>	<b>56</b>
	<210> 54	
	<211> 60	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 36 de CRISPR	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(60)	
	<400> 54	
20	<b>tgcctattgg attgtagtga actttcgaga ggcttataat ctctttgcfg tgaacggcat</b>	<b>60</b>
	<210> 55	
	<211> 56	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 37 de CRISPR	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(56)	
	<400> 55	
35	<b>ttaccttggc caactggaat gtttcagttt gggaaatctg gacgccaaac gagact</b>	<b>56</b>
	<210> 56	
	<211> 60	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 38 de CRISPR	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(60)	
	<400> 56	
50	<b>taccttggac aactggaatg tttcagtttg ggaatctgg acgccaaacg agactggggc</b>	<b>60</b>
	<210> 57	
	<211> 58	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 38 de CRISPR	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(58)	
	<400> 57	
65	<b>tggctgatgt tacaaaatga tgaaccagag gactttgtca tagctactgg ggaagttc</b>	<b>58</b>

# ES 2 712 303 T3

<210> 58  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 39 de CRISPR  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(46)  
 <400> 58  
 15 **aaccctcgac tgcctgtgtc gtccccacag ctaagagctg ggccac** 46  
 <210> 59  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 40 de CRISPR  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(45)  
 <400> 59  
 30 **aaccctcgac tgcctgtgtc gtccccacag ctaagagctg ggcca** 45  
 <210> 60  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 41 de CRISPR  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(56)  
 <400> 60  
 45 **tgcctgtgtc gtccccacag ctaagagctg ggccacaggt ttgtgggcac caggac** 56  
 <210> 61  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 42 de CRISPR  
 <220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(60)  
 <400> 61  
 60 **aaccccaacg cctgagcacc tctacaaaaa attcgcgaga catggactat ggtgcagagc** 60  
 <210> 62  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65

ES 2 712 303 T3

<220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 42 de CRISPR  
  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(59)  
  
 <400> 62  
 10 **accccaacgc ctgagcacct ctacaaaaaa ttcgcgagac atggactatg gtgcagagc** 59  
  
 <210> 63  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 43 de CRISPR  
  
 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(57)  
  
 <400> 63  
 25 **gagctcatga gaaccaaccc caacgcctga gcacctctac aaaaaattcg cgagaca** 57  
  
 <210> 64  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 44 de CRISPR  
  
 <220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(56)  
  
 <400> 64  
 40 **caacccaac gcctgagcac ctctacaaaa aattcgcgag acatggacta tgggtgc** 56  
  
 <210> 65  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 45 de CRISPR  
  
 <220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(59)  
  
 <400> 65  
 55 **agaccatcga ccataaaccc tcgactgcct gtgtcgtccc cacagctaag agctgggcc** 59  
  
 <210> 66  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 46 de CRISPR  
  
 <220>  
 65 <221> misc\_feature

ES 2 712 303 T3

<222> (1)..(60)  
 <400> 66  
 5 **gaaccaaccc caacgcctga gcacctctac aaaaaattcg cgagacatgg actatggtgc** 60  
 <210> 67  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 47 de CRISPR  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(60)  
 <400> 67  
 20 **agaccatcga ccataaaccc tcgactgcct gtgtcgtccc cacagctaag agctgggcca** 60  
 <210> 68  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 48 de CRISPR  
 <220>  
 30 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(48)  
 <400> 68  
 35 **aactccaga gctaaggcca cttcgctttt gtcaaaggct cctctgaa** 48  
 <210> 69  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 49 de CRISPR  
 <220>  
 45 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(54)  
 <400> 69  
 50 **agtcttgaga ttgtttttct cttttcttat taaatgatct ttctatgaac cagc** 54  
 <210> 70  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 50 de CRISPR  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(57)  
 <400> 70  
 65 **ccactcctga gaccatcgac cataaacct cgactgcctg tgctgtcccc acagcta** 57

<210> 71  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 51 de CRISPR  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 71  
 15 **tgacctcacc gacagcacct gcctagtaa** 29  
 <210> 72  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 52 de CRISPR  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 72  
 30 **atgttgatgg agttggcacc ttgctgctt** 29  
 <210> 73  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 53 de CRISPR  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 73  
 45 **accccagaaa gagaccacc ctttctatc** 29  
 <210> 74  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 54 de CRISPR  
 <220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 74  
 60 **aggcctcaac tagtgaactg tatggaaaa** 29  
 <210> 75  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65

<220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 55 de CRISPR

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

10 <400> 75  
**tggagttggc accttgccggc ttctggatg** 29

<210> 76  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 56 de CRISPR

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

25 <400> 76  
**ttggattgta gtgaactttc gagaggctt** 29

<210> 77  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 57 de CRISPR

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

40 <400> 77  
**gcttataatc tctttgcggt gaacggcat** 29

<210> 78  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 58 de CRISPR

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

55 <400> 78  
**acgccaaacg agactggggc catgccaaag** 29

<210> 79  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 59 de CRISPR

65 <220>  
 <221> misc\_feature

	<222> (1)..(29)	
	<400> 79	
5	<b>gctccaaggc gcagcagaaa ctgaactgg</b>	29
	<210> 80	
	<211> 29	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 60 de CRISPR	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(29)	
	<400> 80	
20	<b>aacccaacg cctgagcacc tctacaaaa</b>	29
	<210> 81	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 61 de CRISPR	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(29)	
	<400> 81	
35	<b>actcctgaga ccatcgacca taaaccctc</b>	29
	<210> 82	
	<211> 29	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 62 de CRISPR	
	<220>	
45	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(29)	
	<400> 82	
50	<b>acccaacgc ctgagcacct ctacaaaaa</b>	29
	<210> 83	
	<211> 29	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de reconocimiento 63 de CRISPR	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(29)	
	<400> 83	
65	<b>caacccaac gcctgagcac ctctacaaa</b>	29

ES 2 712 303 T3

<210> 84  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 64 de CRISPR  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 84  
 15 **agaccatcga ccataaaccc tcgactgcc** 29  
 <210> 85  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 65 de CRISPR  
 <400> 85  
 25 **ctctacaaaa aattcgcgag acatggact** 29  
 <210> 86  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 66 de CRISPR  
 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 86  
 40 **gcaccaggac ggggacactc cagagctaa** 29  
 <210> 87  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 67 de CRISPR  
 50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 87  
 55 **taaggccact tcgcttttgt caaaggctc** 29  
 <210> 88  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 68 de CRISPR  
 65 <220>

ES 2 712 303 T3

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

5 <400> 88  
**cgaccataaaa ccctcgactg cctgtgtcg** 29

<210> 89  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 69 de CRISPR

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

20 <400> 89  
**gaaccaaccc caacgcctga gcacctcta** 29

<210> 90  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 70 de CRISPR

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

35 <400> 90  
**aaccctcgac tgctgtgtc gtccccaca** 29

<210> 91  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 71 de CRISPR

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

50 <400> 91  
**gagggagatg gtgcaagccg atgtggagc** 29

<210> 92  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 72 de CRISPR

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)

65 <400> 92  
**taagagctgg gccacaggtt tgtgggcac** 29

<210> 93  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento 73 de CRISPR  
 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <400> 93  
 15 **tgggccacag gtttgtgggc accaggacg** 29  
 <210> 94  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> CEBADOR DIRECTO  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(26)  
 <400> 94  
 30 **aagaaataag ctgaatcagc tctgac** 26  
 <210> 95  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> CEBADOR INVERSO  
 <220>  
 40 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(23)  
 <400> 95  
 45 **gtgctaattct gacctaacca gag** 23  
 <210> 96  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> CEBADOR DIRECTO  
 <220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)  
 <400> 96  
 60 **gatccttcag tgttccaagt ac** 22  
 <210> 97  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65

<220>  
 <223> CEBADOR INVERSO

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)

10 <400> 97  
**ctggttgagta acagaaacct c** 21

15 <210> 98  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> CEBADOR DIRECTO

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)

30 <400> 98  
**gacgtagtct tcagctattc** 20

35 <210> 99  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> CEBADOR INVERSO

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)

50 <400> 99  
**gtgcagaaag aaagcagaaa c** 21

55 <210> 100  
 <211> 499  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> ARNg + andamiaje para el exón 7 de Fut8

65 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(499)

70 <400> 100

ES 2 712 303 T3

attccaagat gagtgttcgc gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60  
 cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgctttt ttgctccgcg gcacgagaac 120  
 tcaaagcccc ggggcctggg tcccacgcgg ggtcccttac ccagggtgcc ccgggcgctc 180  
 atttgcatgt cccacccaac aggtaaacct gacaggatcat cgcggccagg tacgacctgg 240  
 cggtcagagc accaaacata cgagccttgt gatgagttcc gttgcatgaa attctcccaa 300  
 aggctccaag atggacagga aagggcgcgg ttcggtcacc gtaagtagaa taggtgaaag 360  
 actcccgtgc cttataaggc ctgtgggtga cttcttctca ccgaattggc gctatgctac 420  
 tgggttttag agctagaaat agcaagttaa aataaggcta gtccgttatc aacttgaaaa 480  
 agtggcaccg agtcggtgc 499

5 <210> 101  
 <211> 499  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> ARNg + andamiaje para el exón 3 de GMD

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(499)

15 <400> 101

actaggcagg tgctgtcggg gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60  
 cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgctttt ttgctccgcg gcacgagaac 120  
 tcaaagcccc ggggcctggg tcccacgcgg ggtcccttac ccagggtgcc ccgggcgctc 180  
 atttgcatgt cccacccaac aggtaaacct gacaggatcat cgcggccagg tacgacctgg 240  
 cggtcagagc accaaacata cgagccttgt gatgagttcc gttgcatgaa attctcccaa 300  
 aggctccaag atggacagga aagggcgcgg ttcggtcacc gtaagtagaa taggtgaaag 360  
 actcccgtgc cttataaggc ctgtgggtga cttcttctca ccgcatcaat gaagtcaaac 420  
 ctagttttag agctagaaat agcaagttaa aataaggcta gtccgttatc aacttgaaaa 480  
 agtggcaccg agtcggtgc 499

20 <210> 102  
 <211> 96  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> ARNg + andamiaje para el exón 4 de GMD

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(96)

<400> 102

ES 2 712 303 T3

agttggcacc ttgcggcttc gtttagagc tagaaatagc aagttaaata aaggctagtc 60

cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgc 96

REIVINDICACIONES

1. Un dominio de unión a ADN del sistema CRISPR, en donde el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de ARN transcrita a partir de la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 45.
2. El dominio de unión a ADN tal y como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la secuencia de ARN transcrita de las SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 45 se une a la secuencia del gen GMD; y en donde la SEQ ID NO: 41 transcribe a la SEQ ID NO: 42; la SEQ ID NO: 43 transcribe a la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 45 transcribe a la SEQ ID NO: 46.
3. Un complejo CRISPR-nucleasa que comprende el dominio de unión a ADN tal y como se reivindica en la reivindicación 1, y nucleasa.
4. El complejo tal como se reivindica en la reivindicación 3, en donde la nucleasa es endonucleasa Cas9 o endonucleasa Cas9n.
5. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de unión a ADN tal como se reivindica en la reivindicación 1.
6. El vector tal como se reivindica en la reivindicación 5, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica la nucleasa.
7. Una célula que comprende un vector tal y como se reivindica en la reivindicación 5.
8. La célula tal como se reivindica en la reivindicación 7, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en COS, CHO-S, CHO-K1, CHO-K1 GS (-/-), CHO-DG44, CHO -DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV, VERO, MDCK, W138, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293-F, HEK293-H, HEK293 -T, YB23HL.P2.G11.16Ag.20, perC6, célula de hibridoma productora de anticuerpos, célula madre embrionaria, célula Namalwa, línea celular de insecto de *Spodoptera fugiperda* (Sf), Pichia, Saccharomyces y Schizosaccharomyces.
9. Un procedimiento *in vitro* de obtención de una célula de inactivación de fucosa, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - a) Obtener una construcción CRISPR-nucleasa que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de unión a ADN tal y como se reivindica en la reivindicación 1; y
  - b) Transfectar una célula con la construcción de la etapa (a) para obtener una célula de inactivación de fucosa, en la que la construcción CRISPR-nucleasa proporciona el complejo CRISPR-nucleasa que comprende el dominio de unión a ADN y nucleasa; y en donde el complejo escinde la secuencia del gen GMD en la célula.
10. Un método *in vitro* de obtención de proteína con fucosilación que varía del 0 % al 100 %, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - a) Cultivar la célula obtenida mediante el método de la reivindicación 9, en donde la célula tiene actividad de fucosilación que varía del 0 % al 100 %; y
  - b) Obtener la proteína expresada por la célula de la etapa (a).
11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la secuencia del gen GMD que codifica la enzima  $\alpha$  GDP-D-manosa 4,6-deshidratasa se escinde en el exón seleccionado del grupo que consiste en el Exón 3, el Exón 4 y una combinación de los mismos; y en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en COS, CHO-S, CHO-K1, CHO-K1 GS (-/-), CHO-DG44, CHO -DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV, VERO, MDCK, W138, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293-F, HEK293-H, HEK293 -T, YB23HL.P2.G11.16Ag.20, perC6, célula de hibridoma productora de anticuerpos, célula madre embrionaria, célula Namalwa, línea celular de insecto de *Spodoptera fugiperda* (Sf), Pichia, Saccharomyces y Schizosaccharomyces.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el método comprende además la adición de L-Fucosa al medio de cultivo.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la proteína es un anticuerpo; en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; o en donde la célula produce una proteína endógena o una proteína codificada por un gen introducido en la célula.

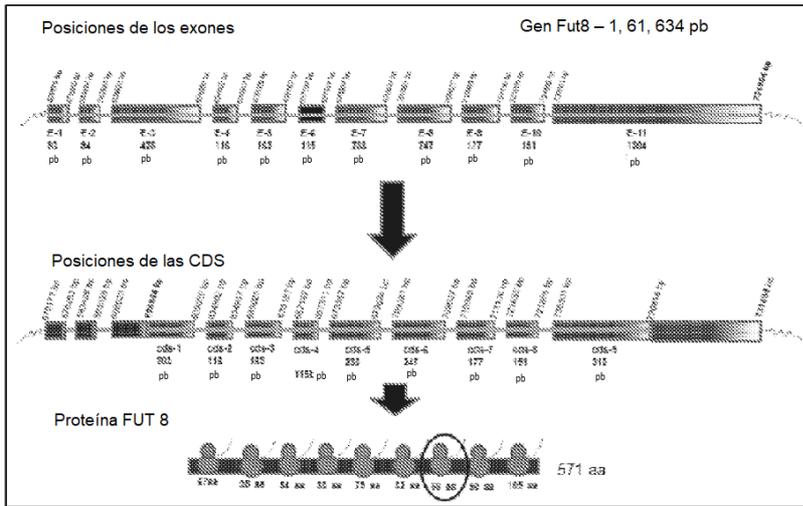


FIGURA 1A

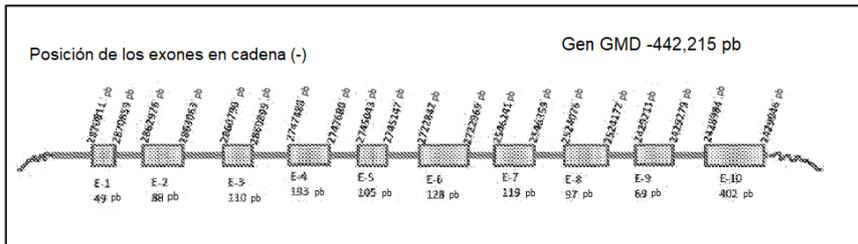


FIGURA 1B



FIGURA 2A

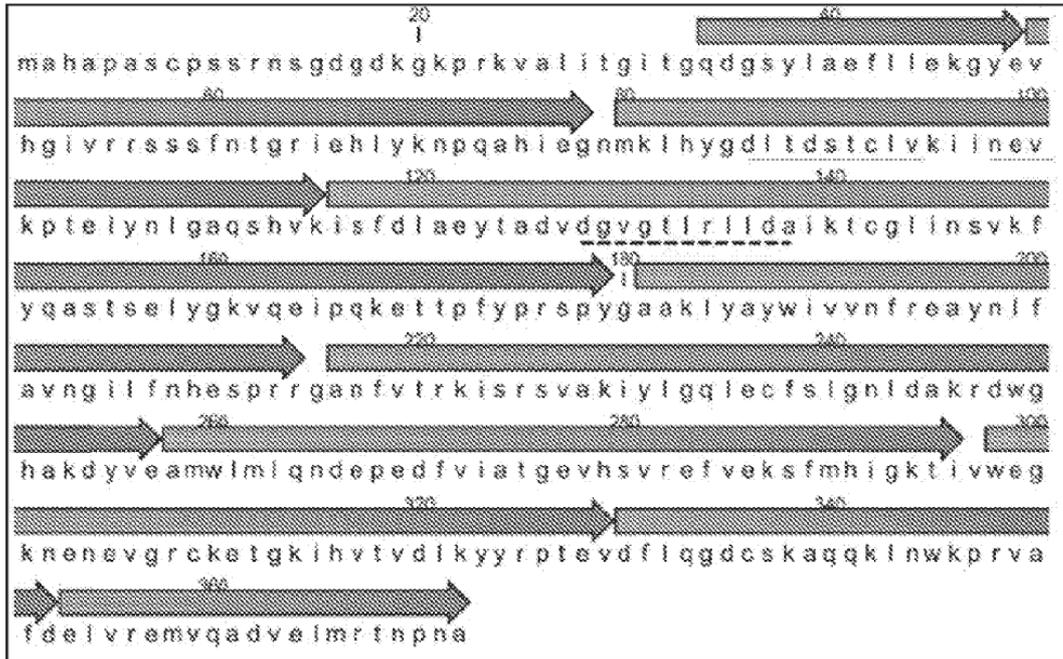


FIGURA 2B

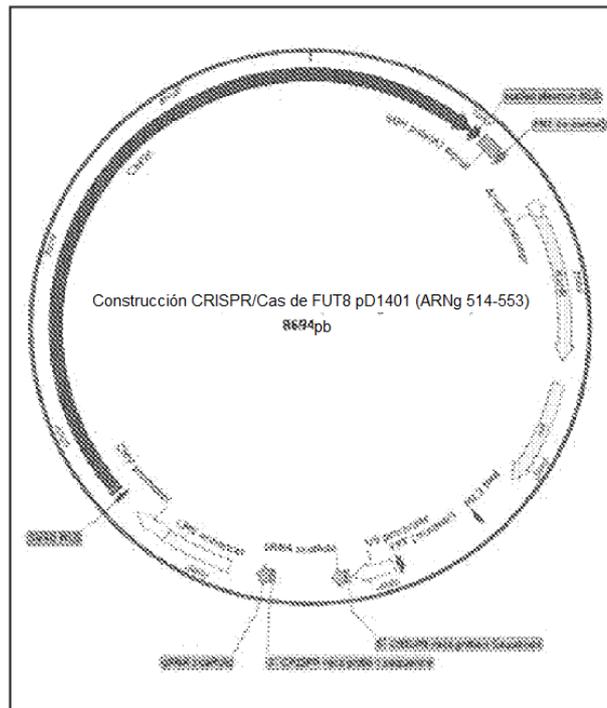


FIGURA 3A

CACCCAGCGAACACTCATCTTGGAAATCTCAGAAATTGGCGCTATGCTACTGGAGGATG  
 GTGGGTCGCTTGTGAGTAGAACCTTAGAGTCTTAACCGCGATACGATGACCTCCTAC

FIGURA 3B

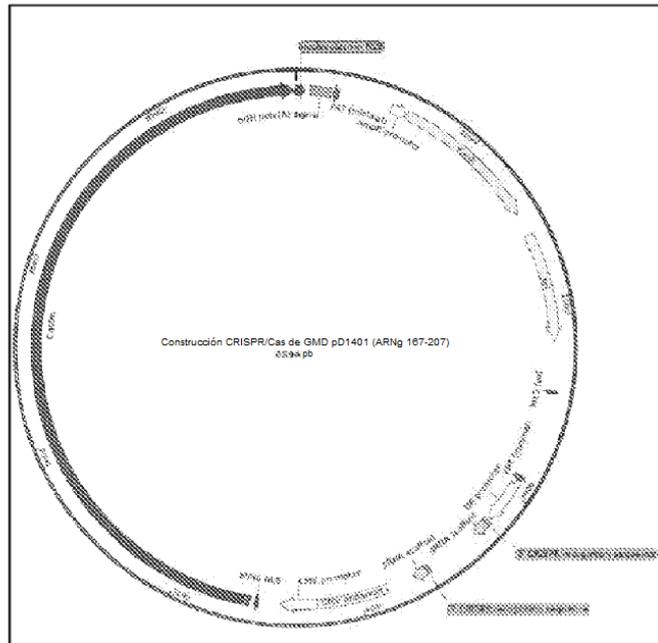


FIGURA 4A

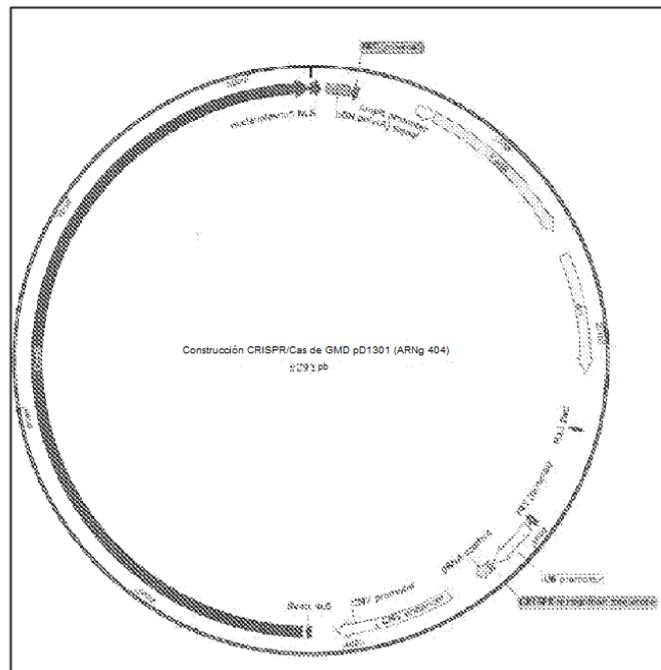


FIGURA 4B

GACCTCACCGACAGCACCTGCCTAGTAAAAATCATCAATGAAGTCAAACCTACAGAGA  
 CTGGAGTGGCTGTCGTGGACGGATCATTTTTAGTAGTTACTTCAGTTTGGATGTCTCT

FIGURA 4C

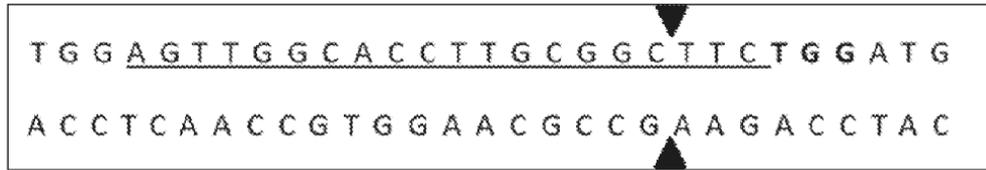


FIGURA 4D

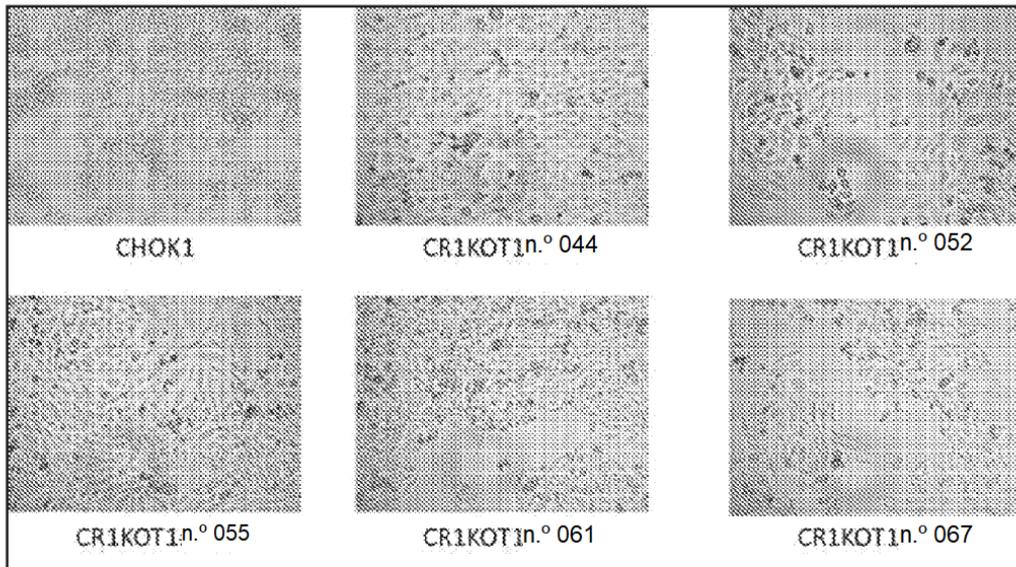


FIGURA 5

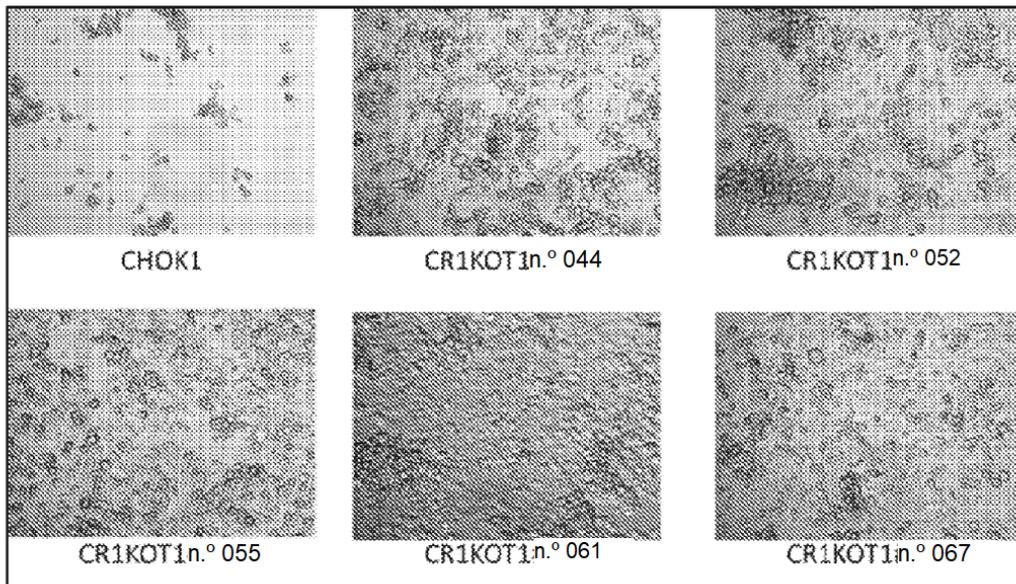
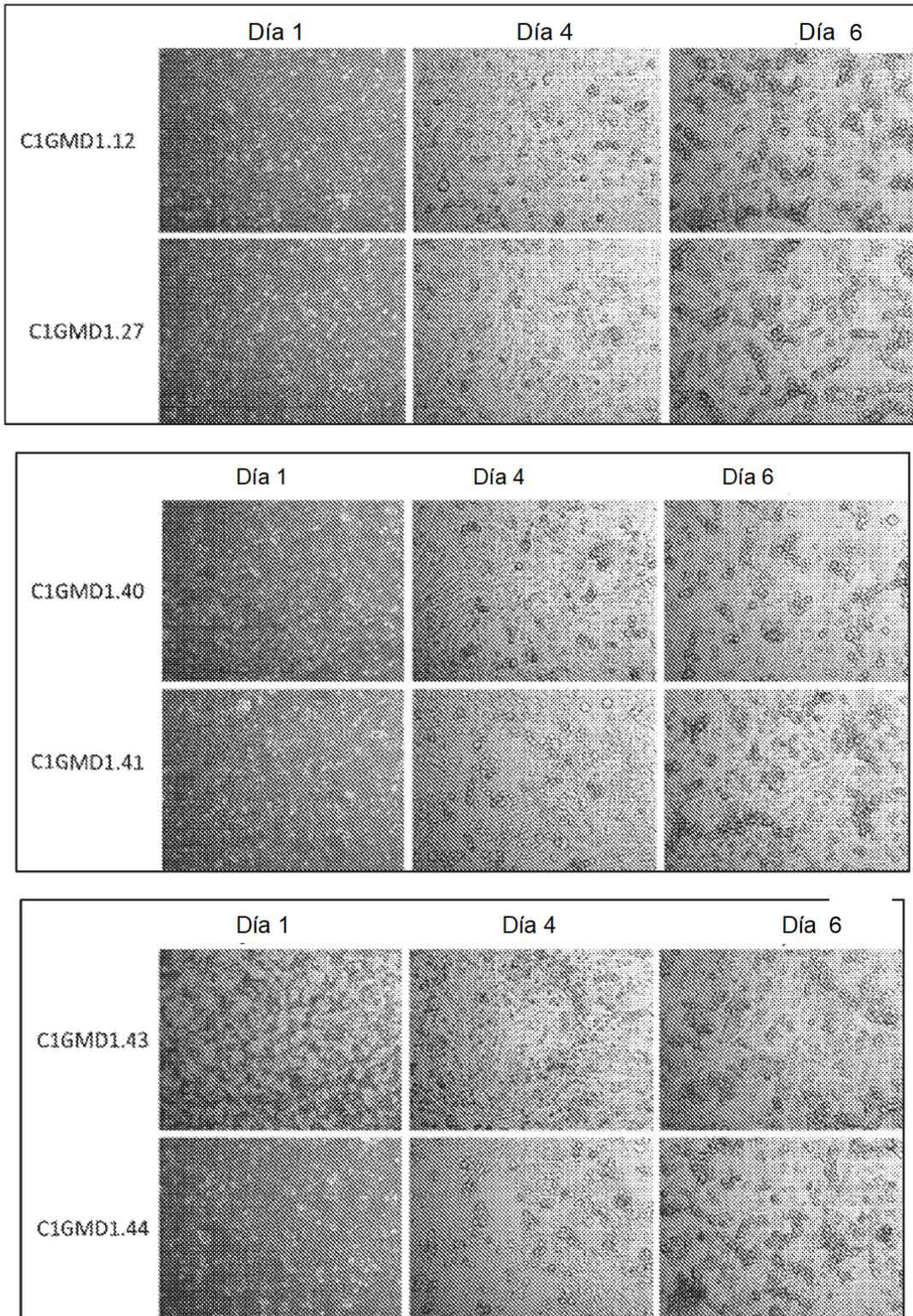


FIGURA 6A



**FIGURA 6B**

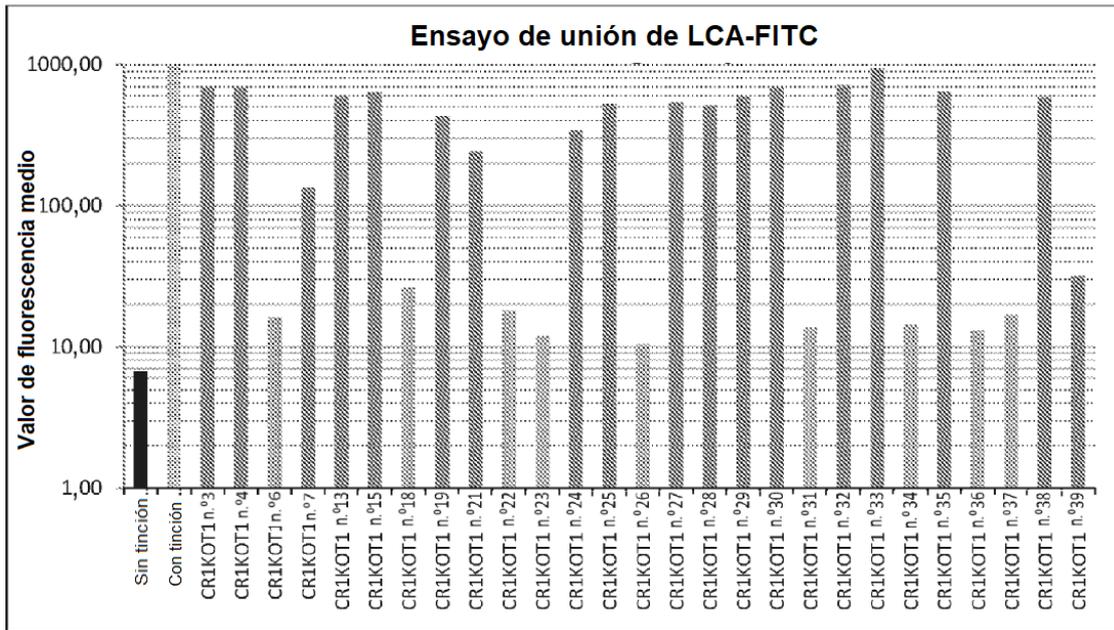


FIGURA 7A

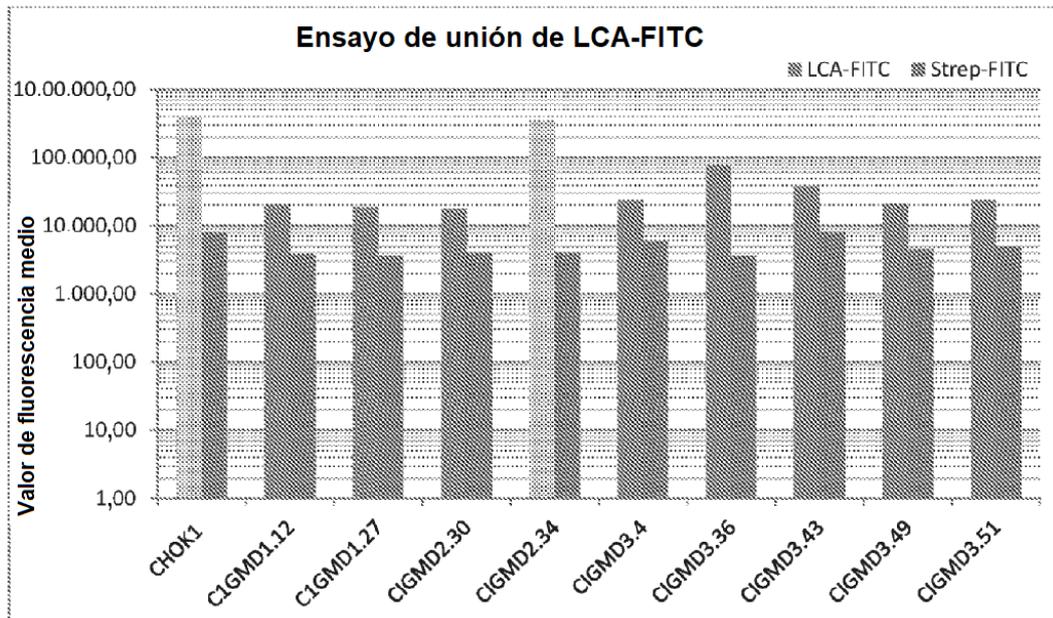
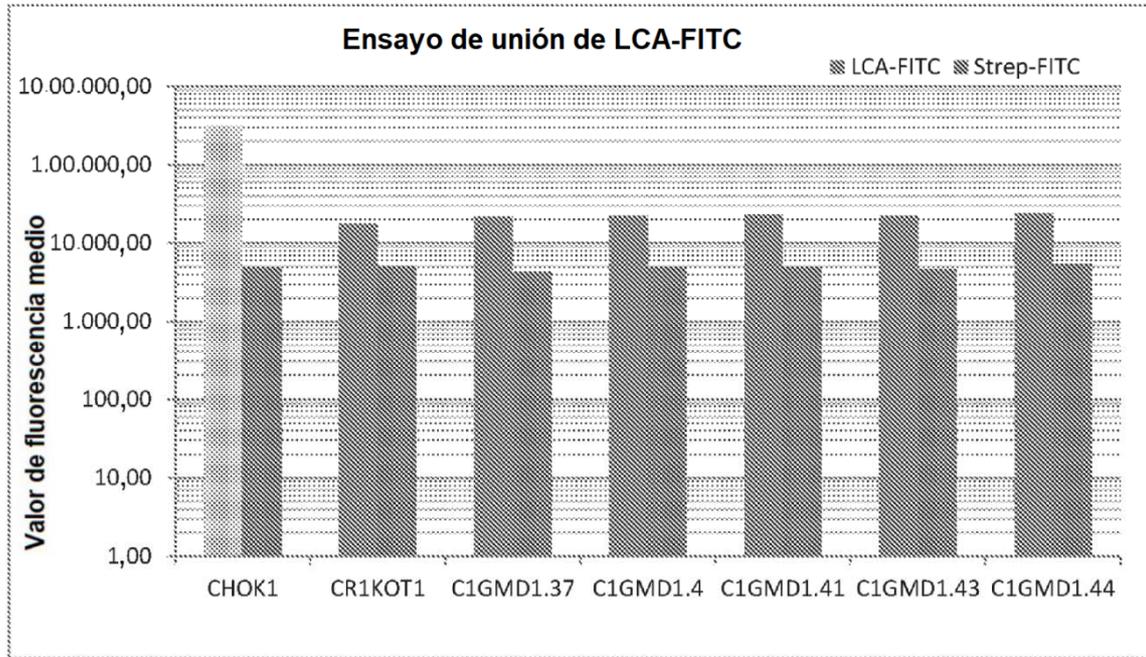


FIGURA 7B



**FIGURA 7C**

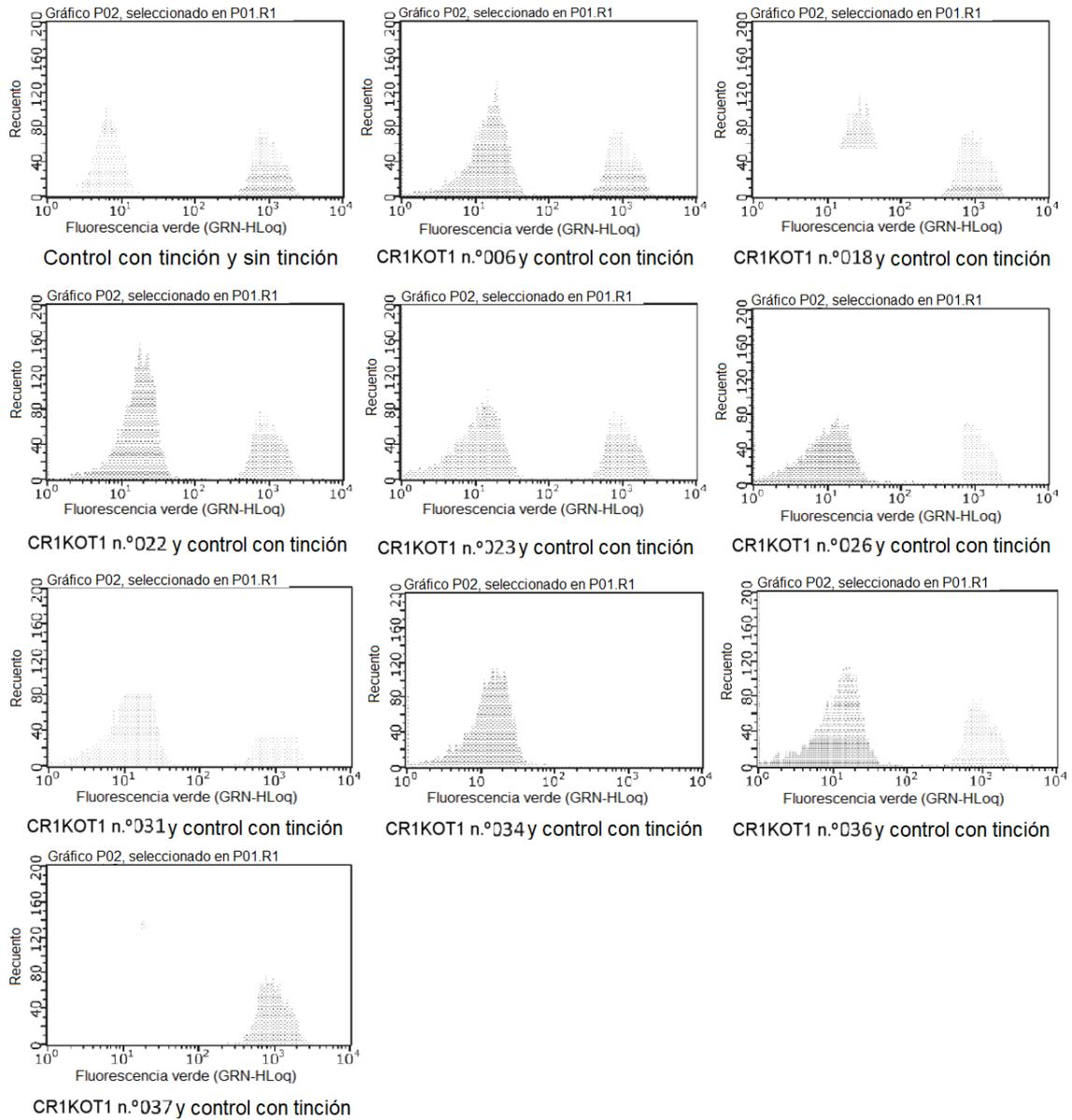


FIGURA 8A

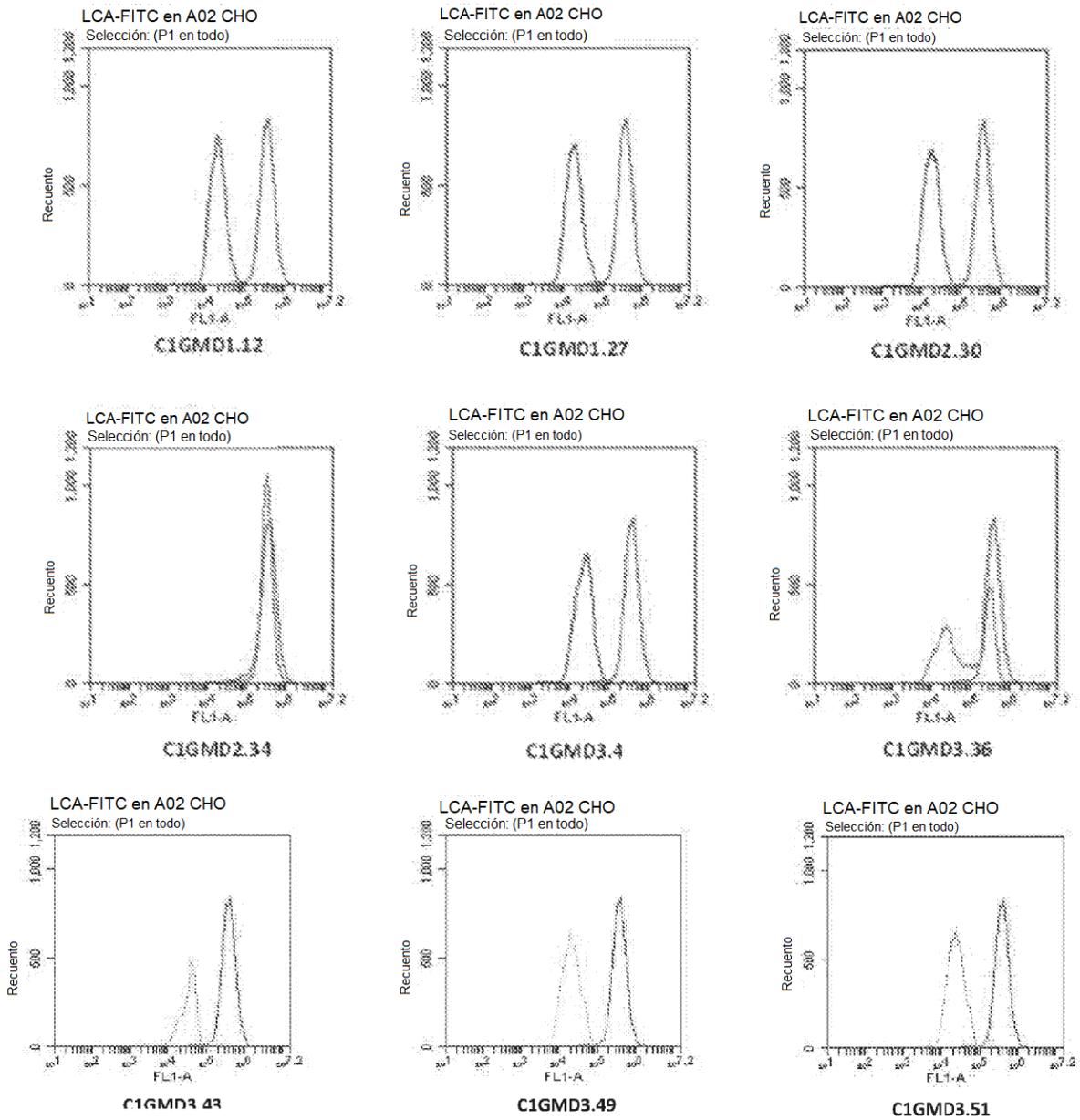


FIGURA 8B

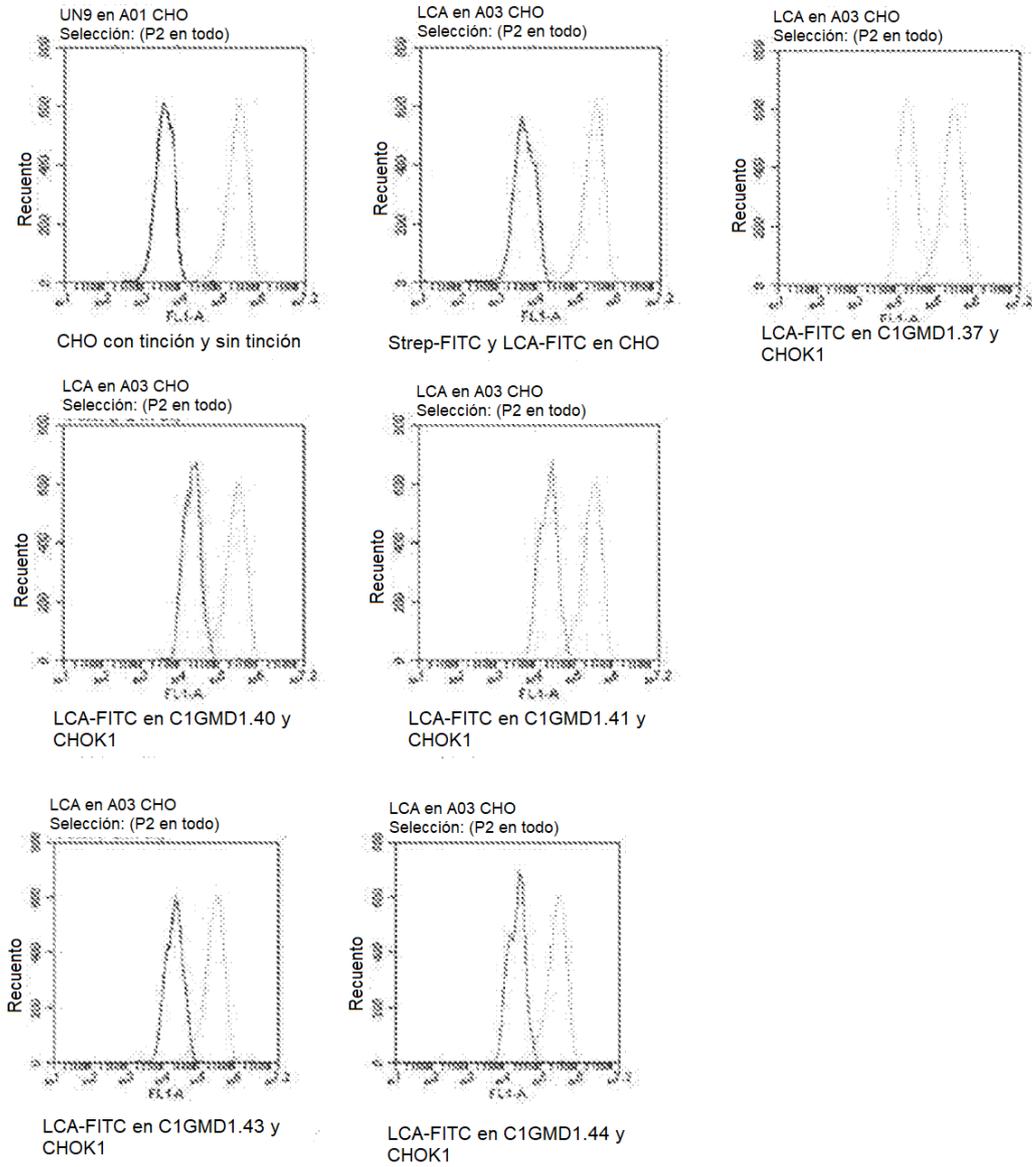


FIGURA 8C

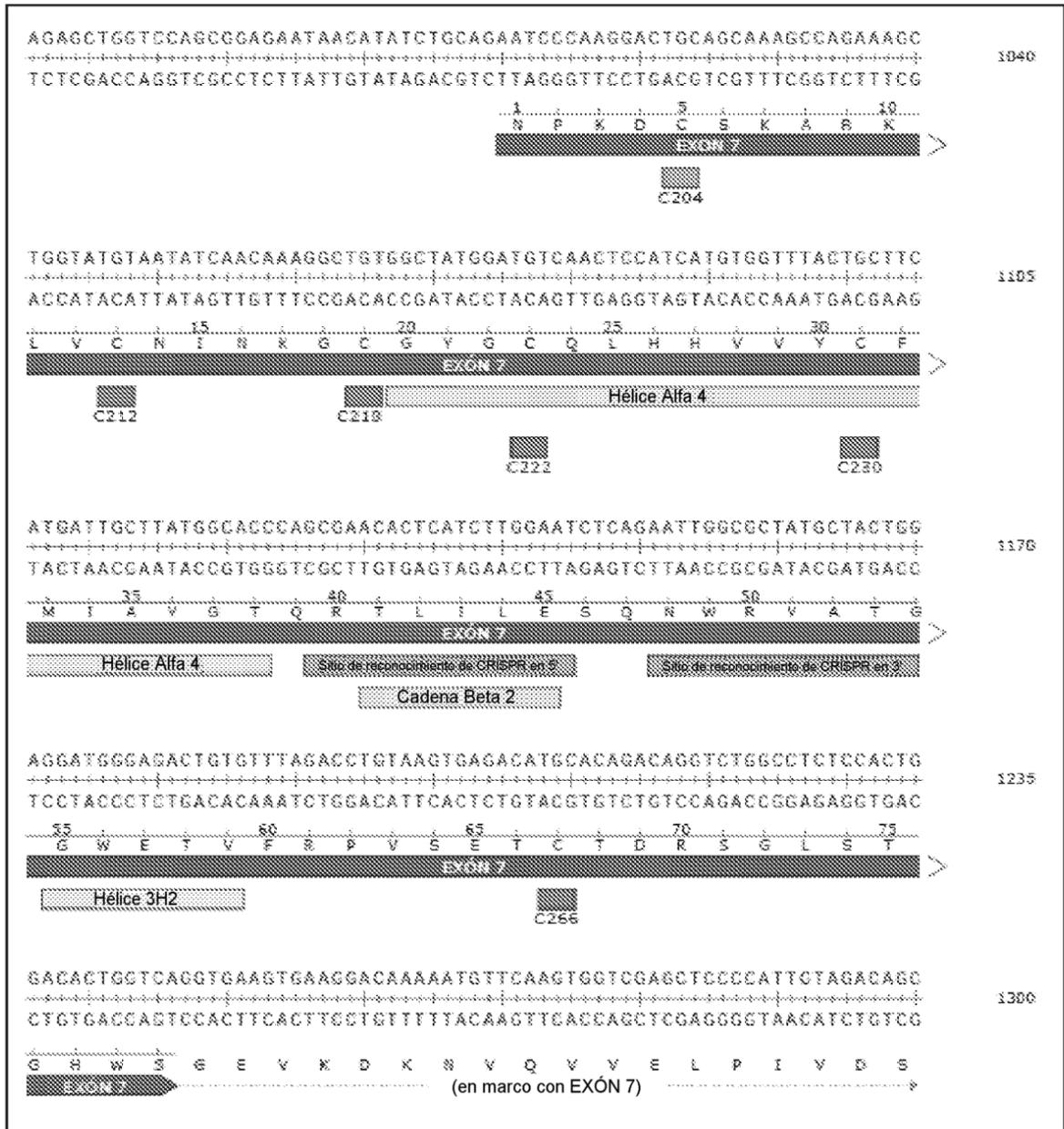


FIGURA 9A

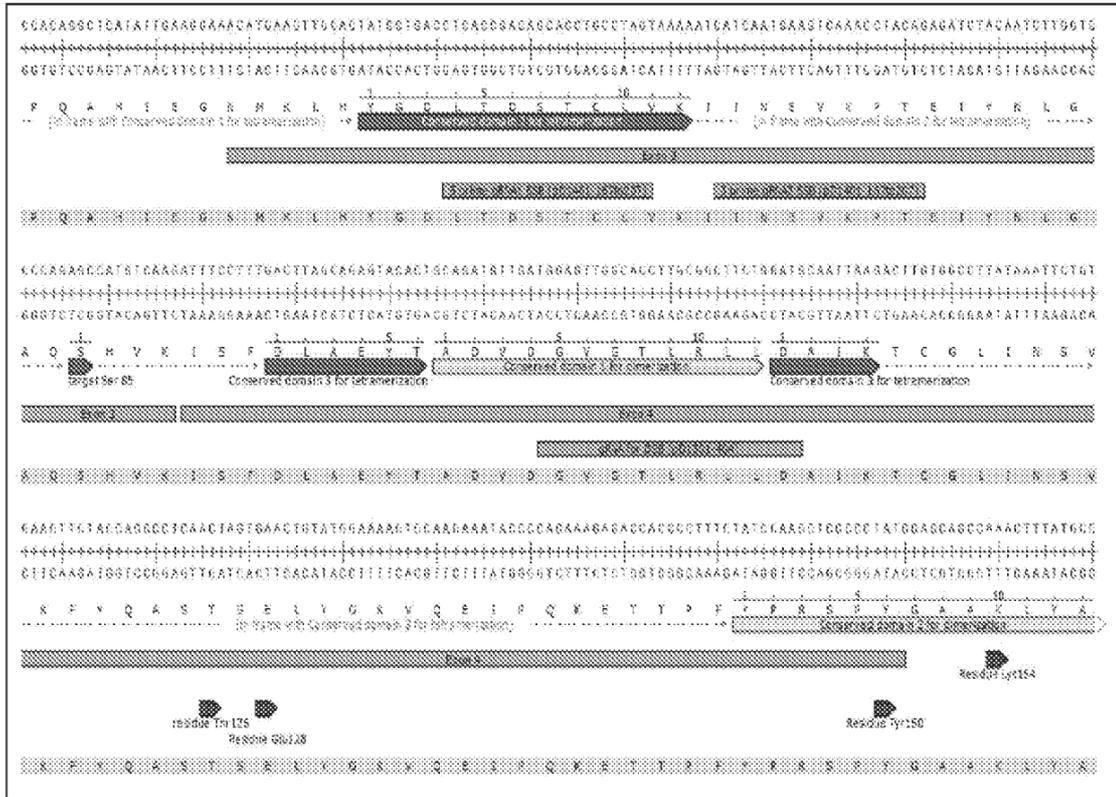


FIGURA 9B

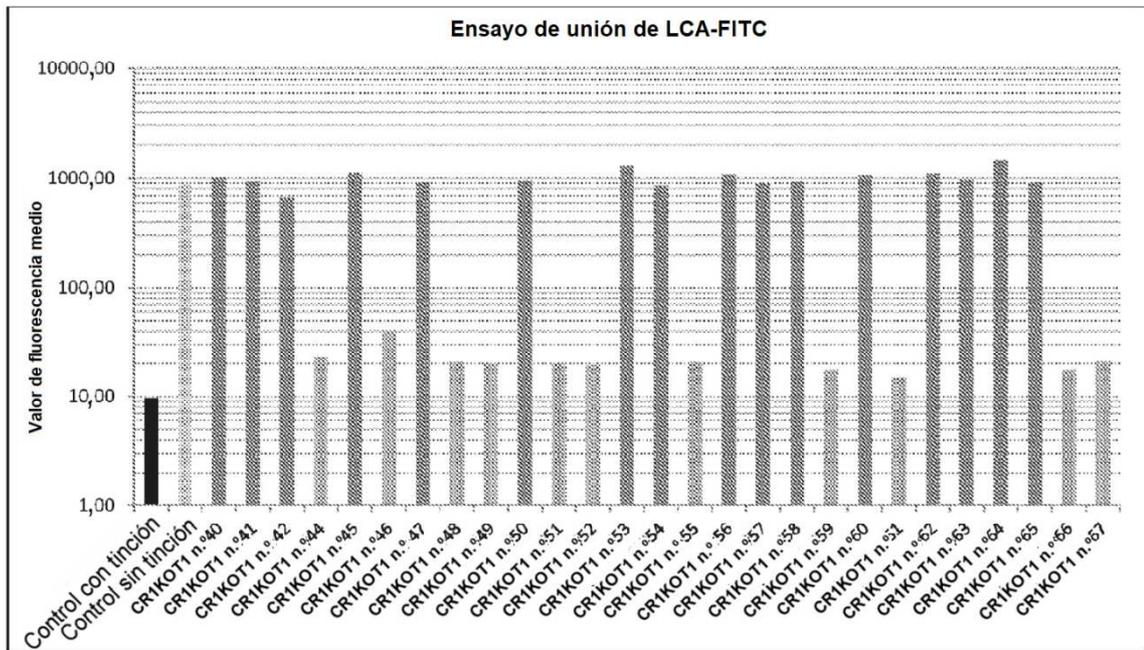


FIGURA 10

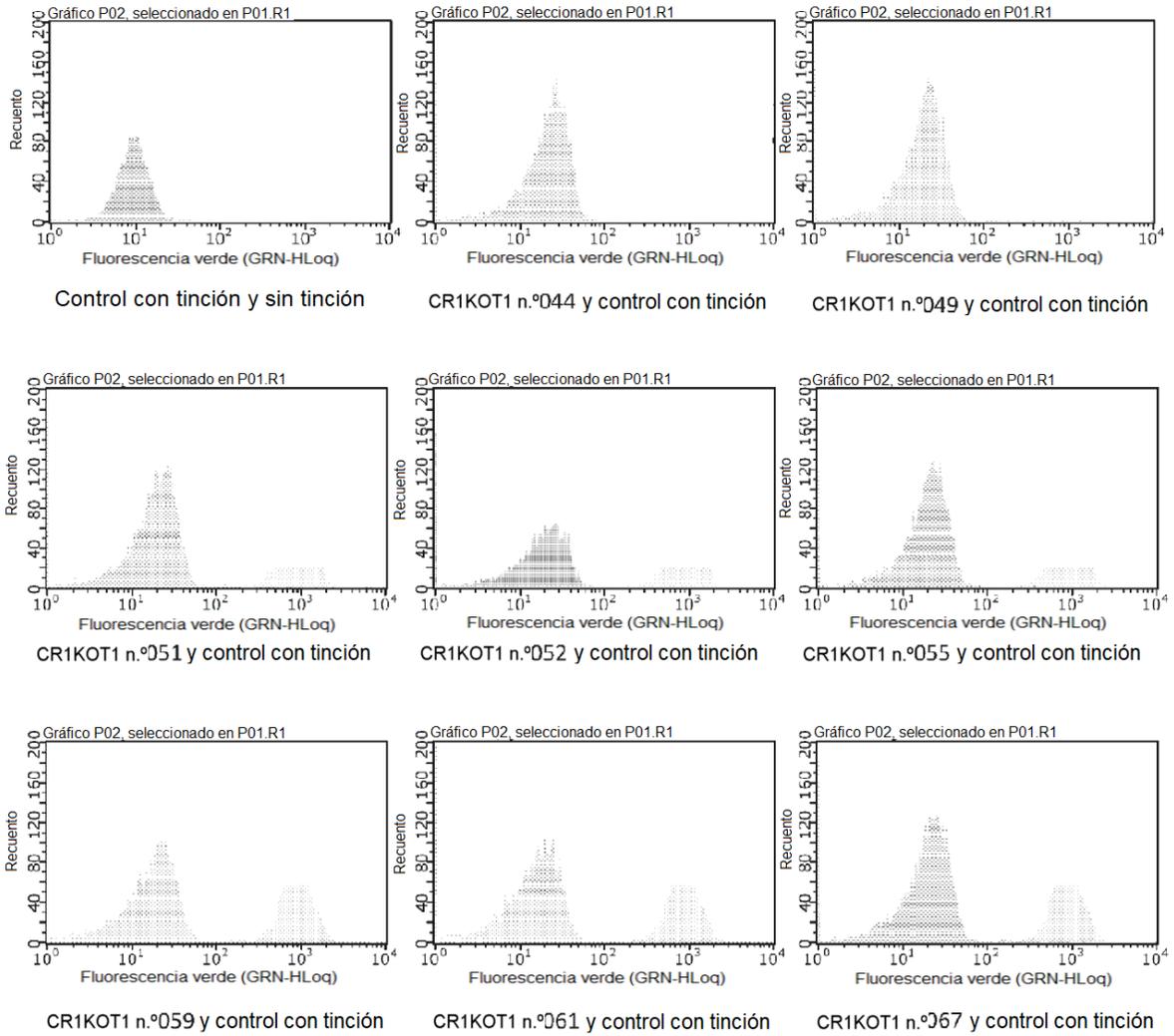


FIGURA 11

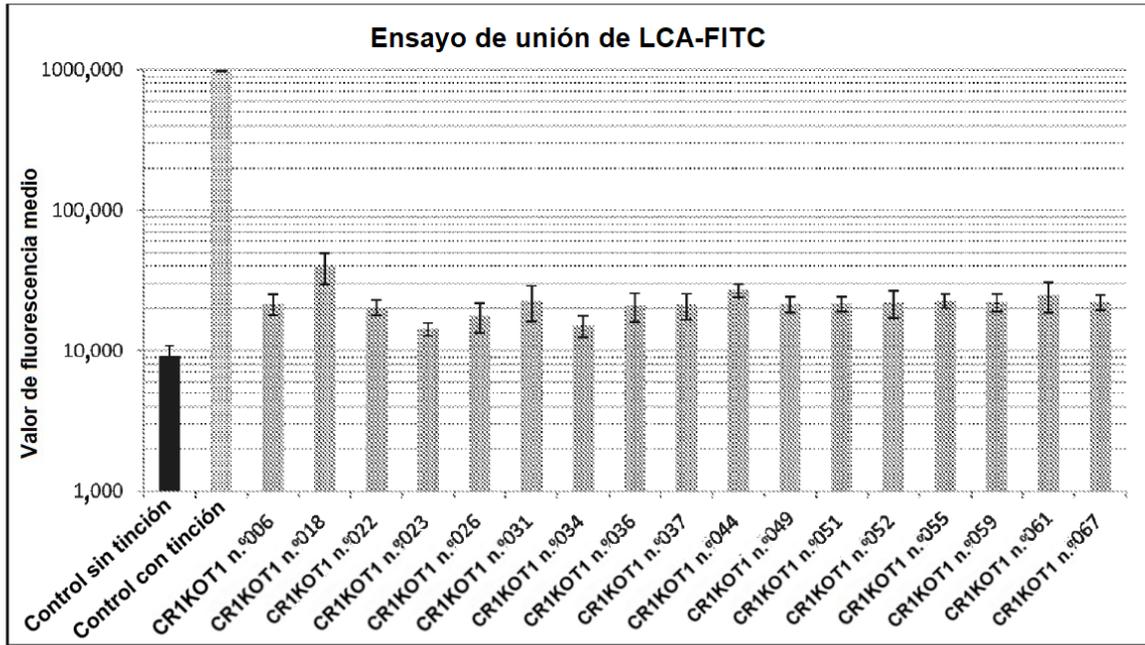


FIGURA 12

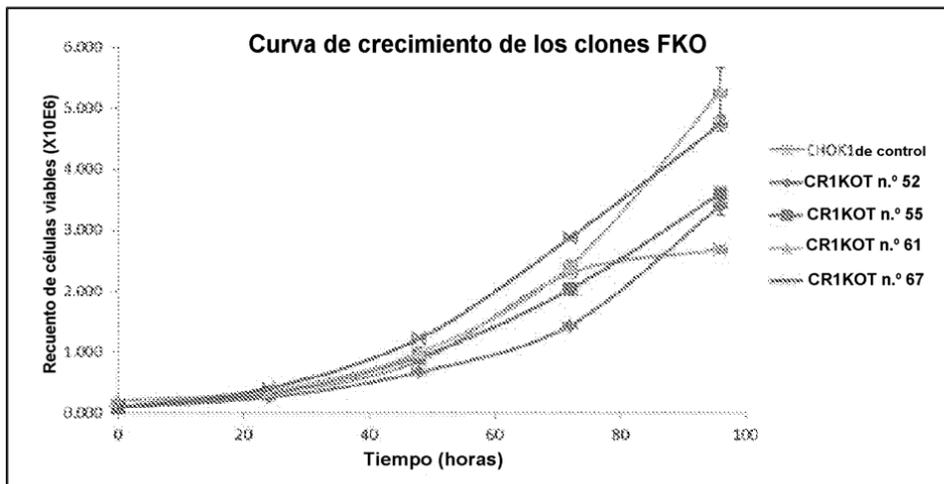


FIGURA 13

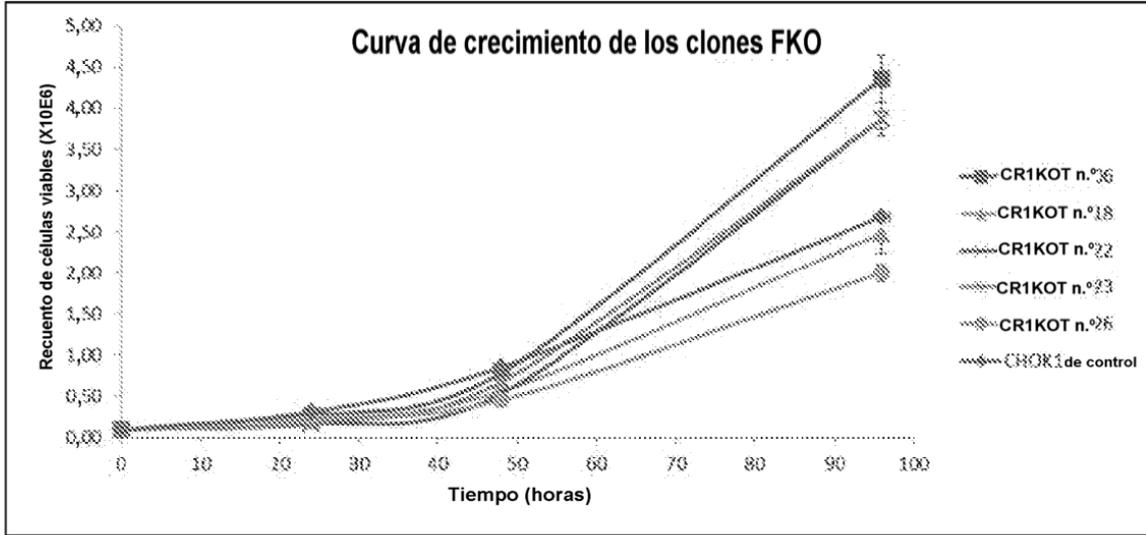


FIGURA 13B

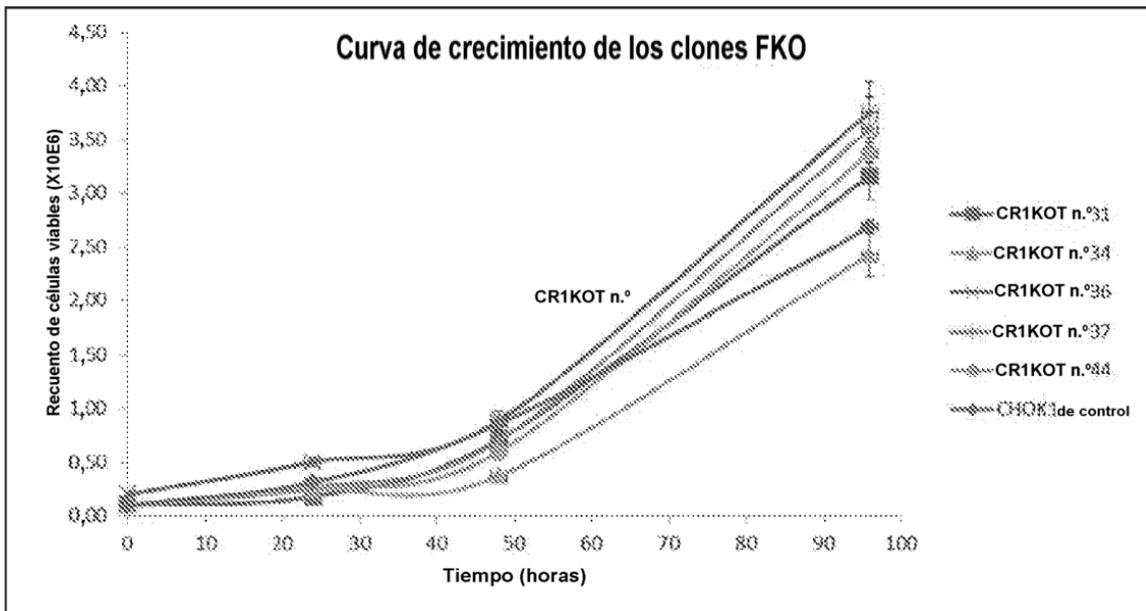


FIGURA 13C

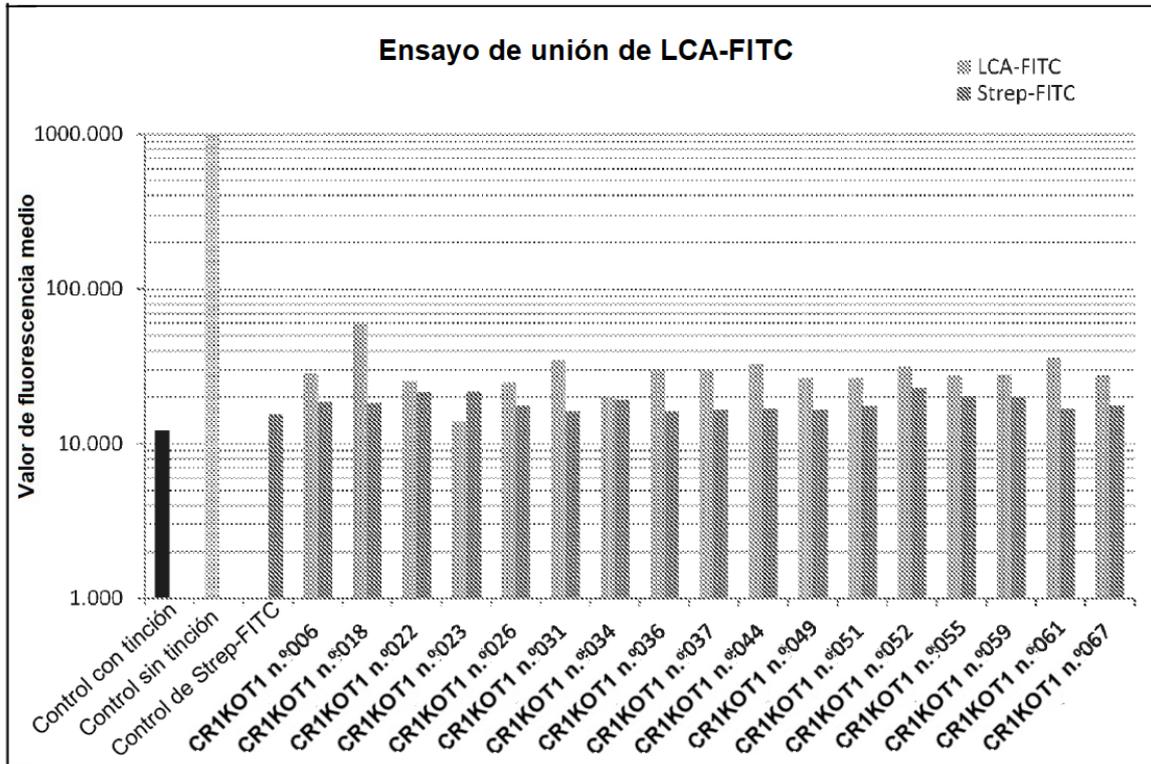


FIGURA 14

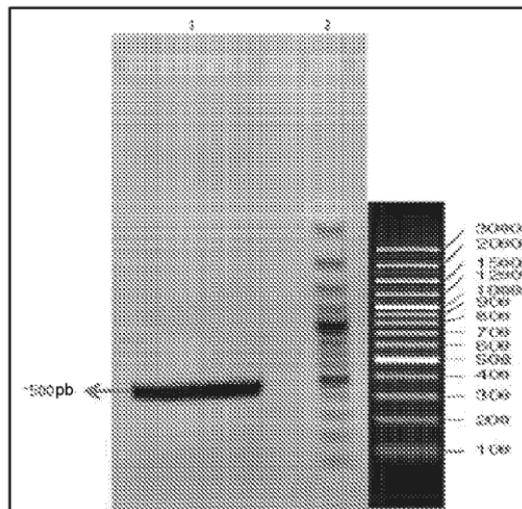


FIGURA 15A

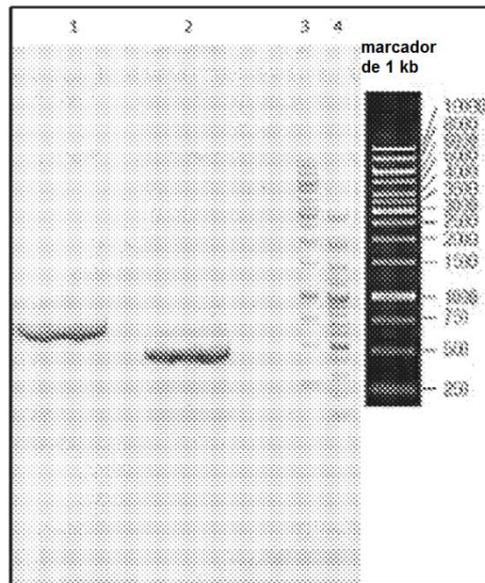


FIGURA 15B

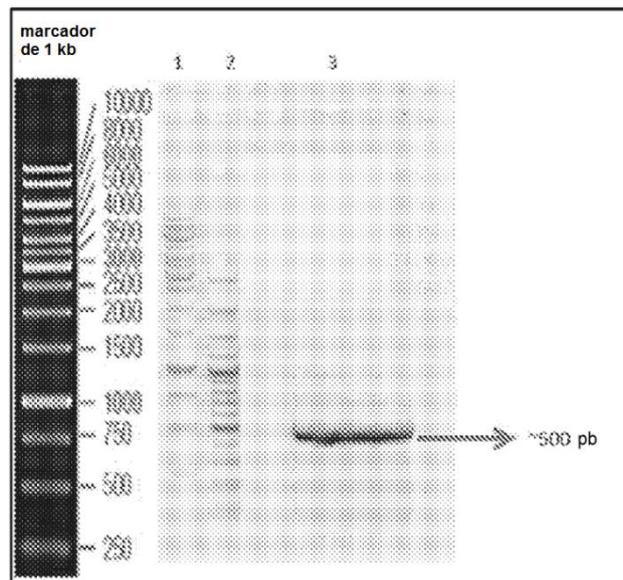


FIGURA 15C

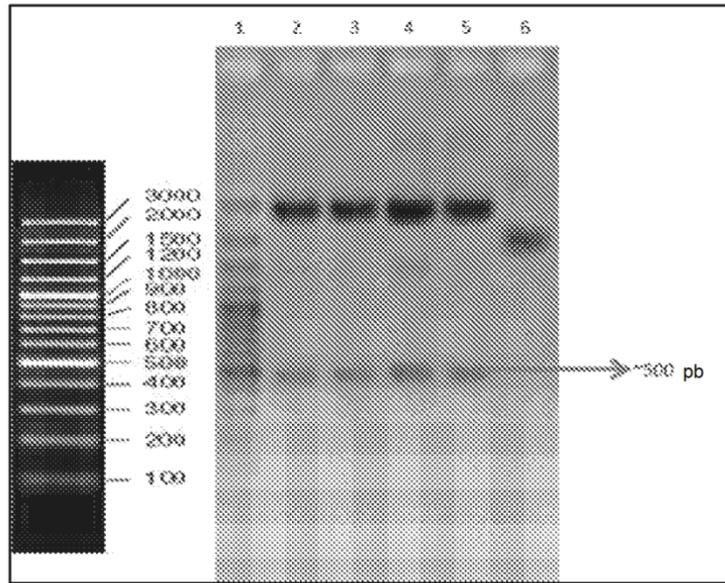


FIGURA 16A

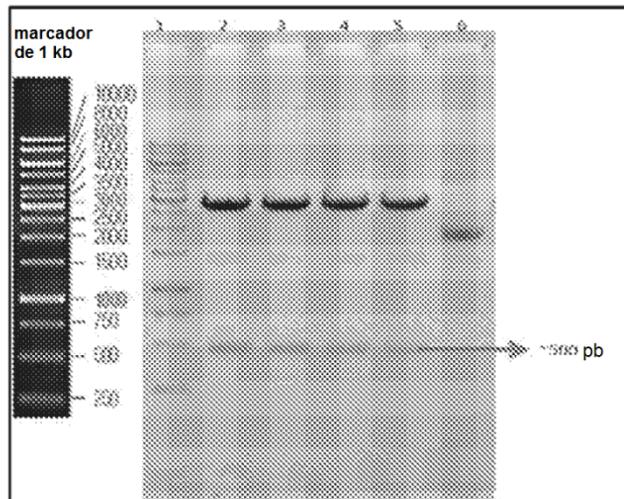


FIGURA 16B

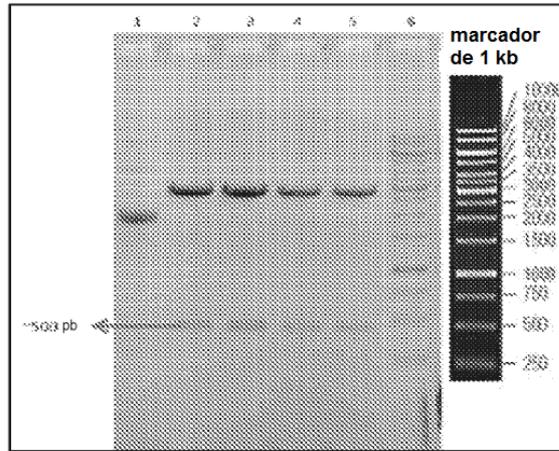


FIGURA 16C

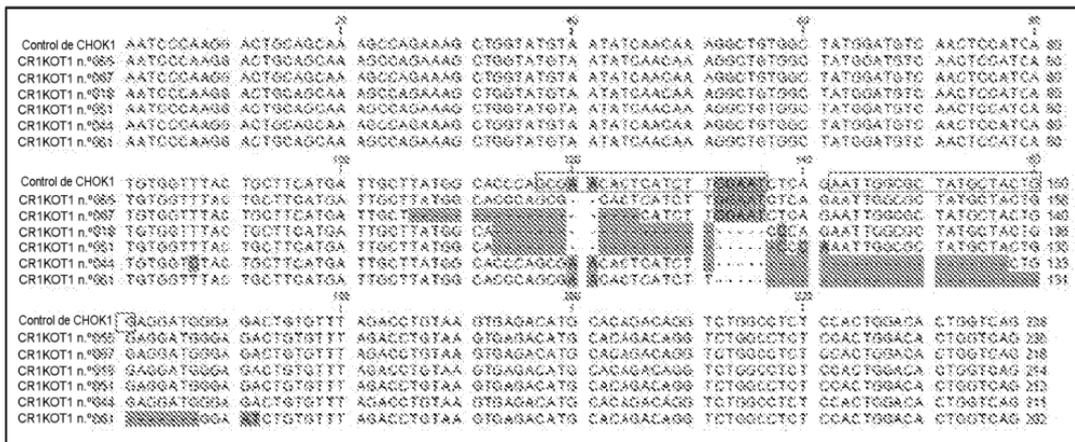


FIGURA 17A

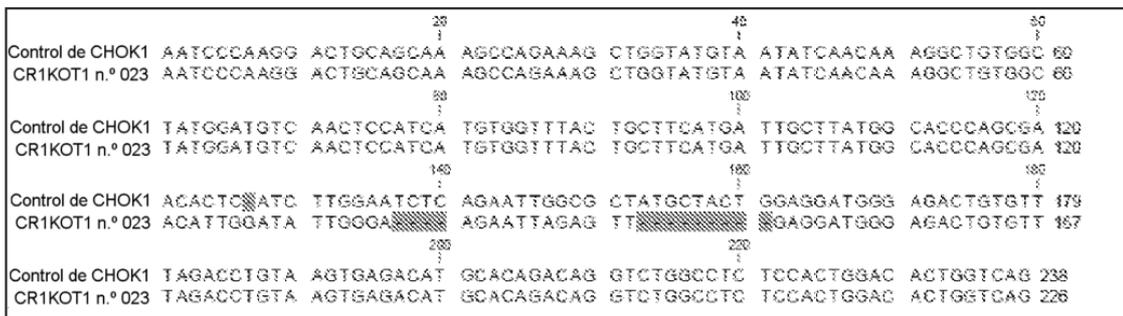


FIGURA 17B



FIGURA 17C

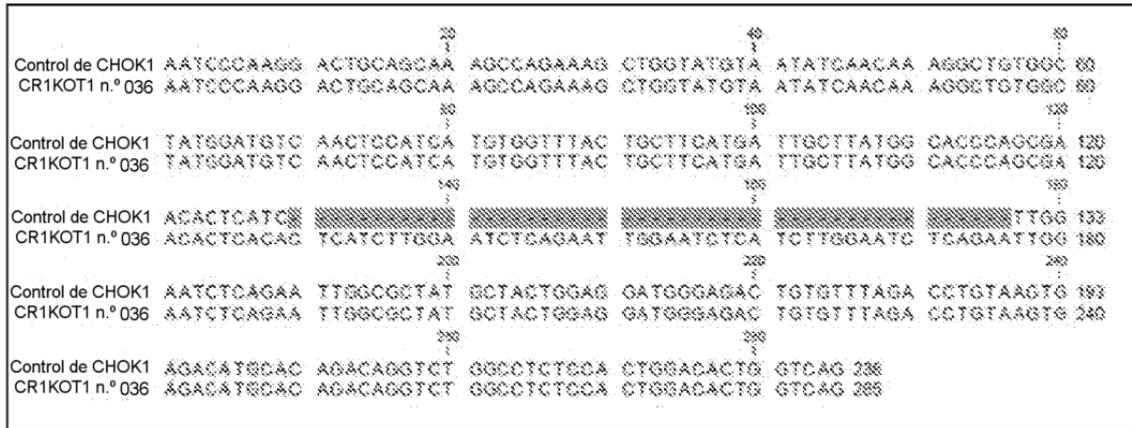
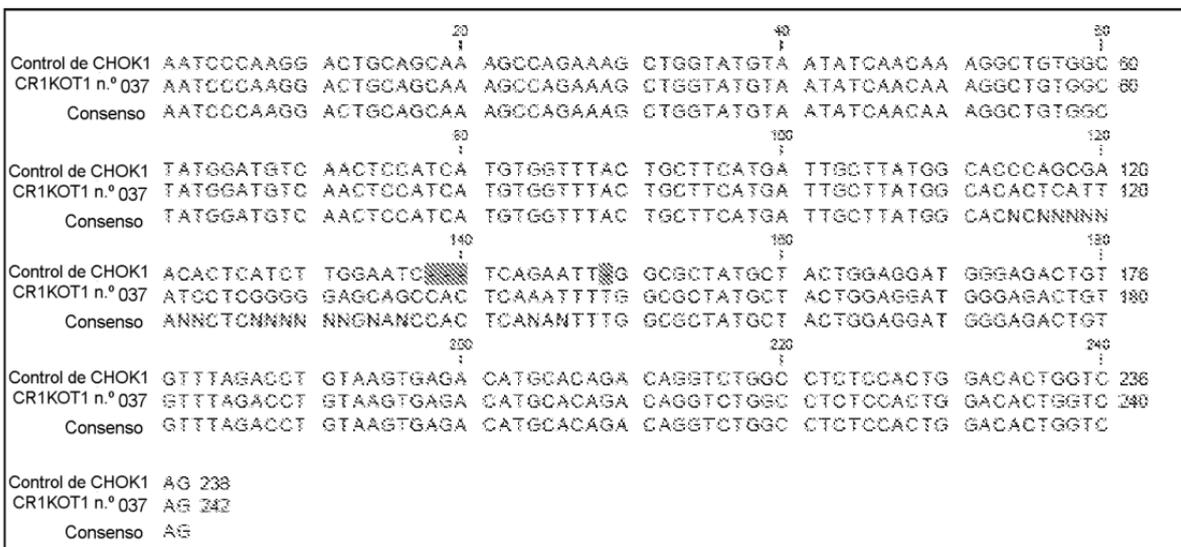


FIGURA 17D



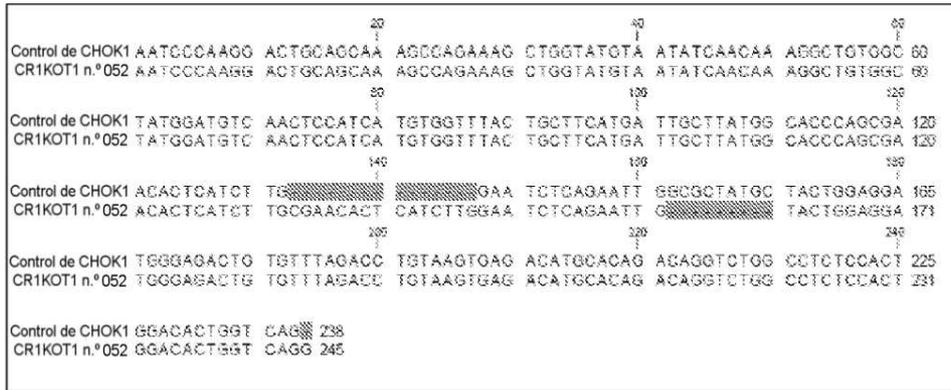


FIGURA 17F

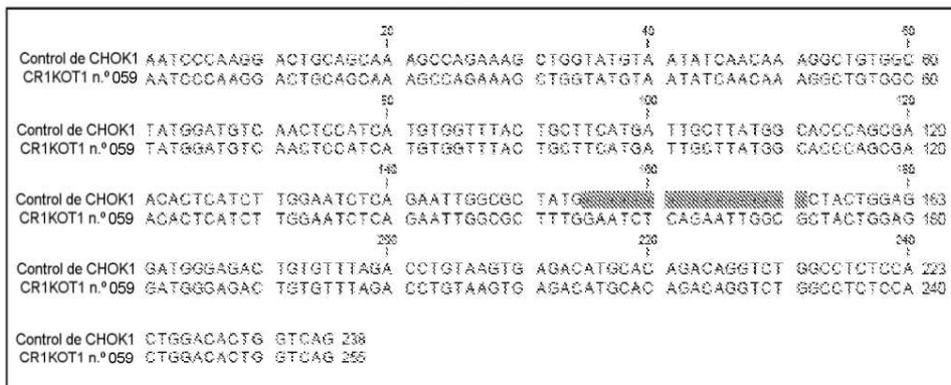


FIGURA 17G

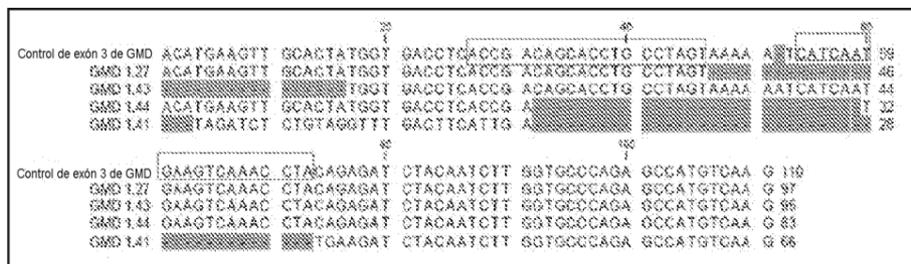


FIGURA 17H

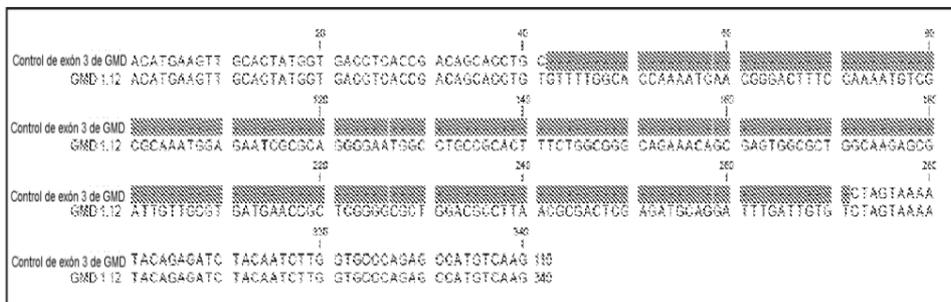


FIGURA 17I

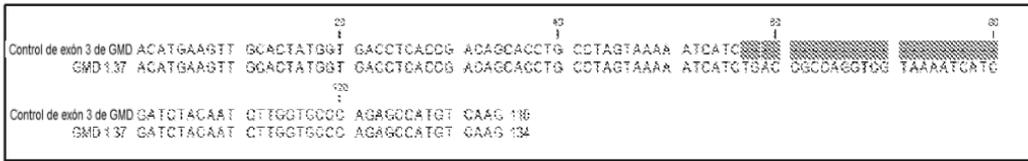


FIGURA 17J

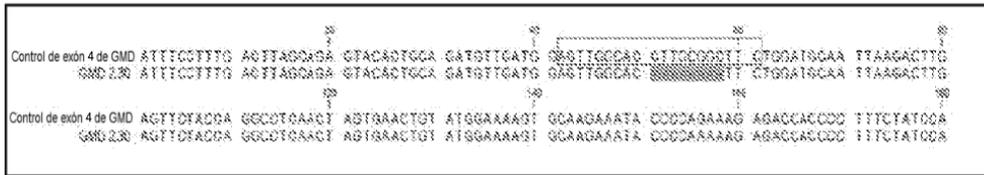


FIGURA 17K



FIGURA 17L

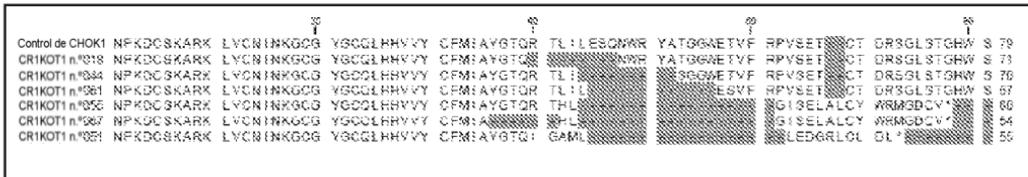


FIGURA 18A

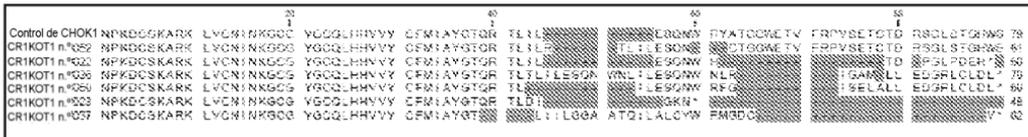


FIGURA 18B

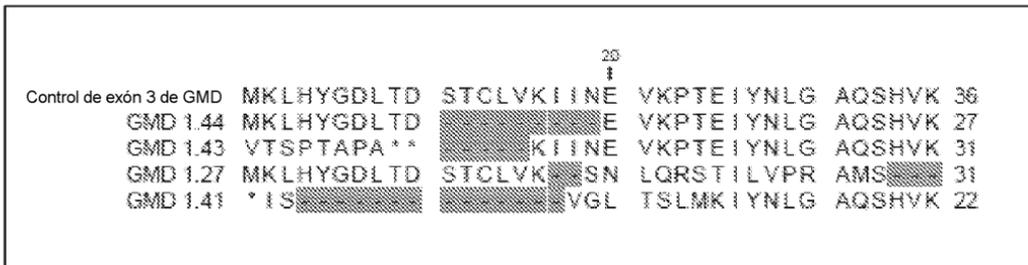


FIGURA 18C

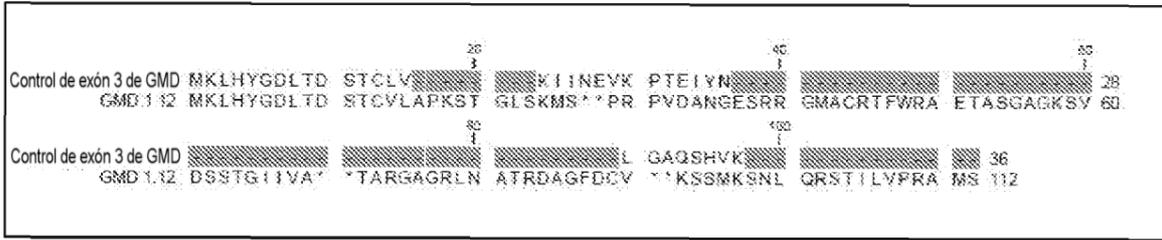


FIGURA 18D

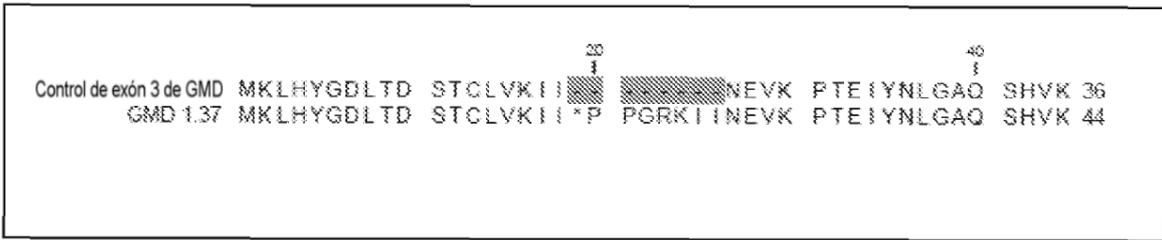


FIGURA 18E



FIGURA 18F

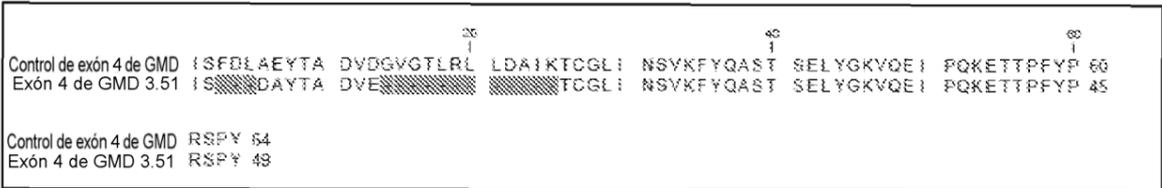


FIGURA 18G

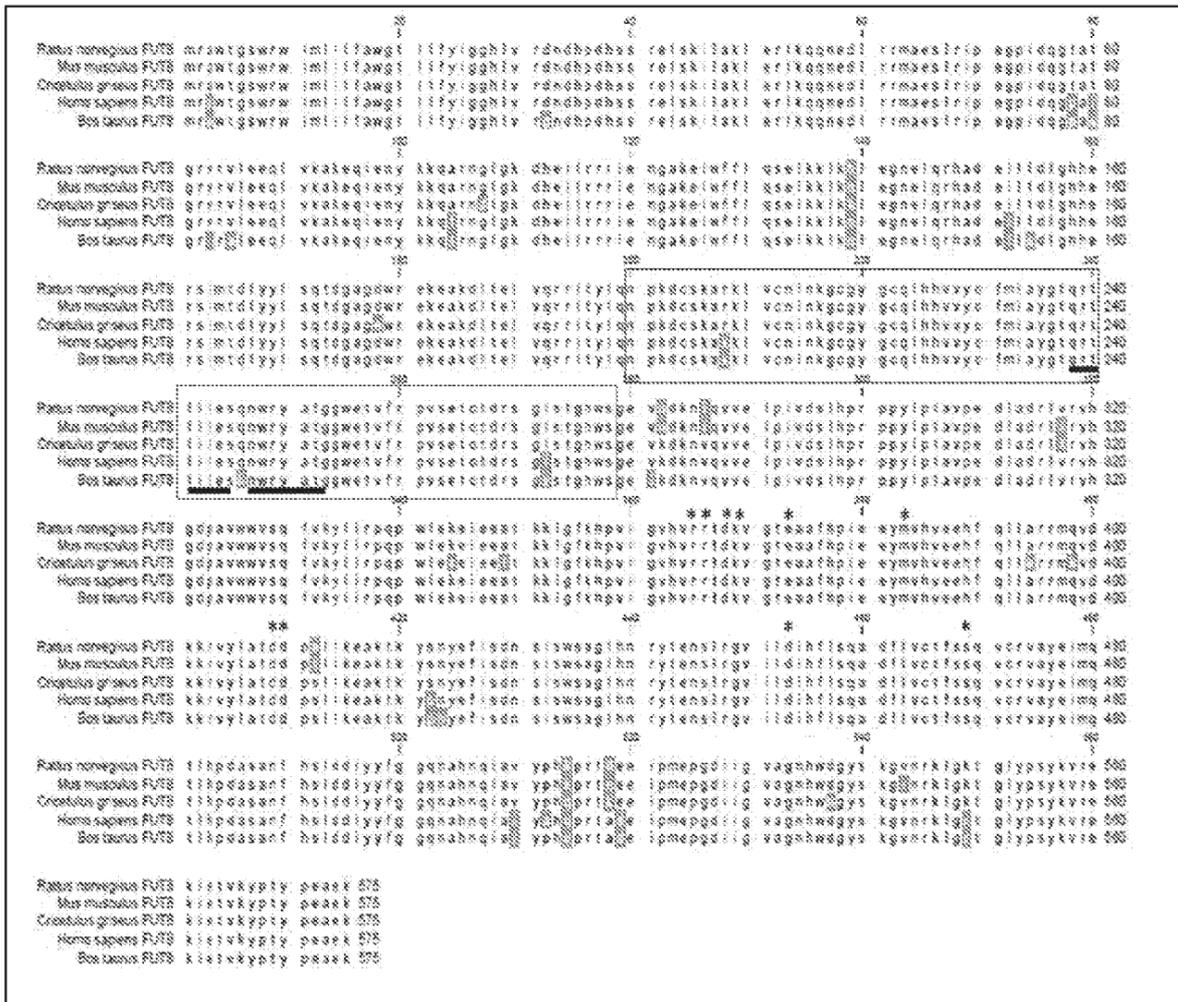
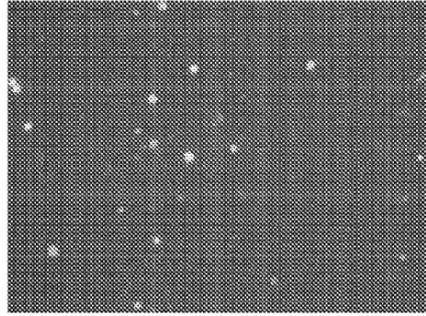
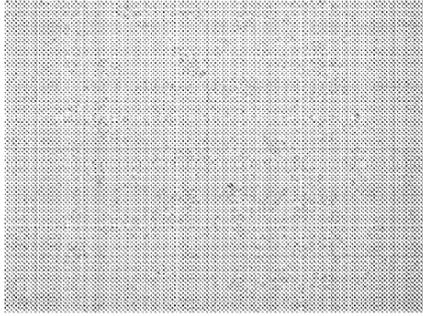
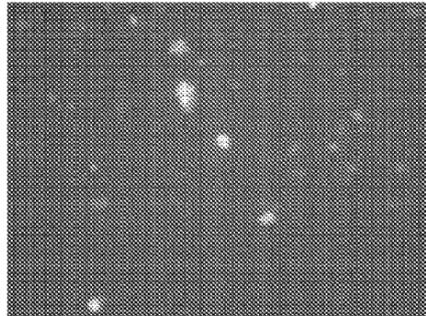
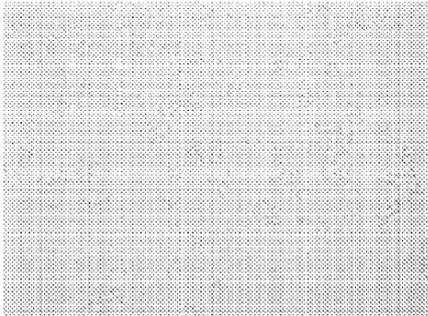


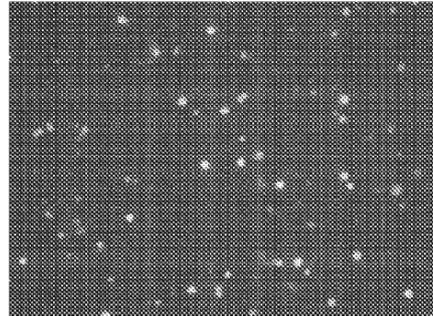
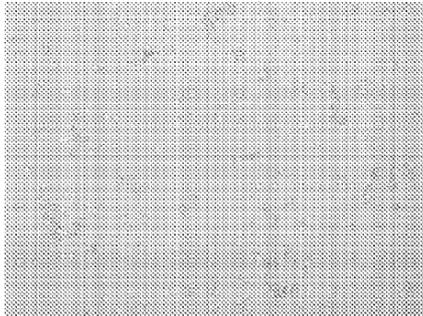
FIGURA 19



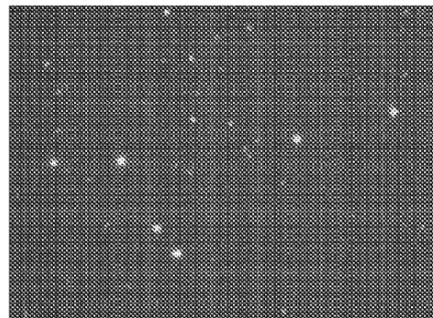
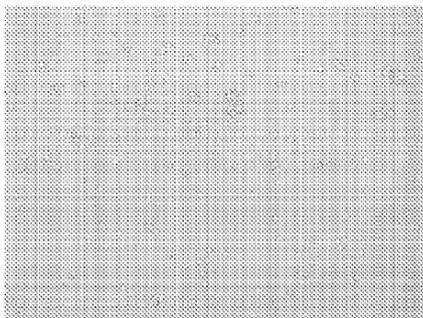
ADN : Lipofectamina 2000 a 1:6 (1  $\mu$ g : 6  $\mu$ l)



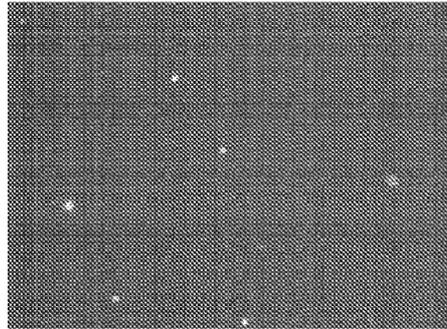
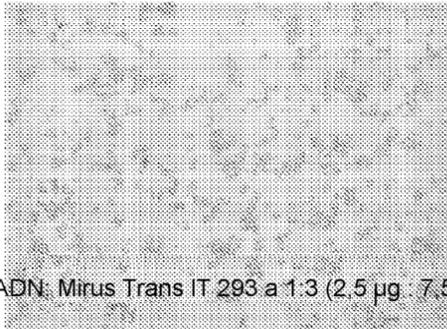
ADN : Lipofectamina 2000 a 1:4 (1,5  $\mu$ g : 6  $\mu$ l)



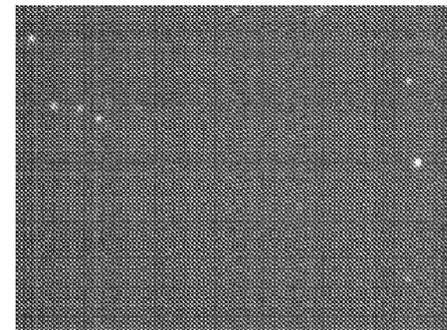
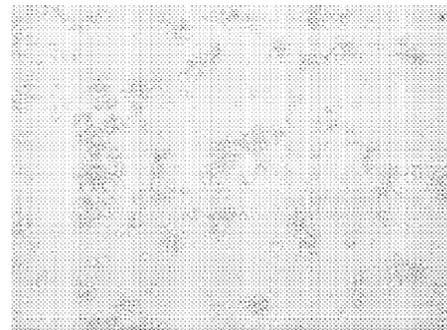
ADN : Lipofectamina 2000 a 1:3 (2  $\mu$ g : 6  $\mu$ l)



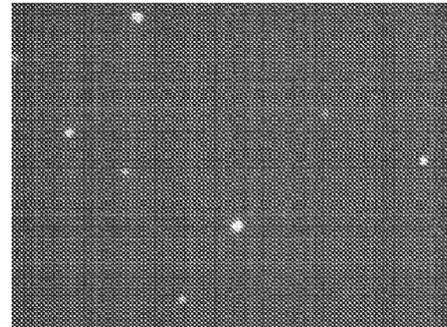
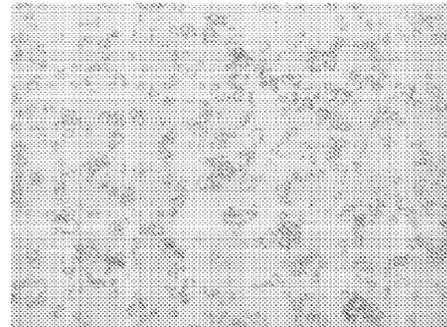
ADN : Lipofectamina 2000 a 1:2.4 (2,5 µg : 6 µl)



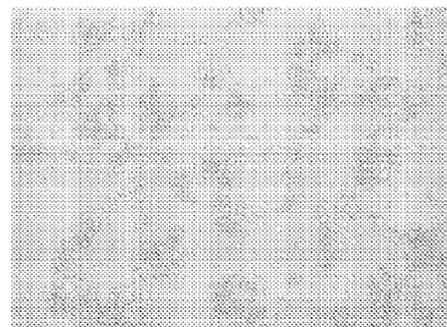
ADN: Mirus Trans IT 293 a 1:3 (2,5 µg : 7,5 µl)



ADN : Mirus Trans IT 2020 a 1:3 (2,5 µg : 7.5µl)

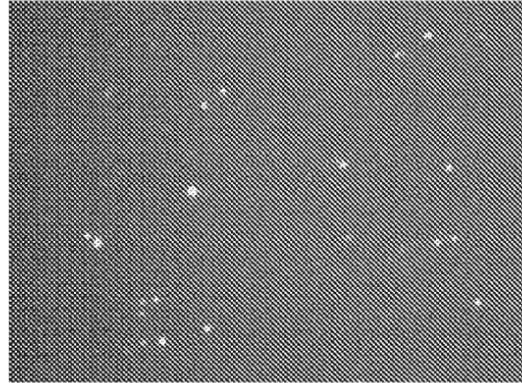
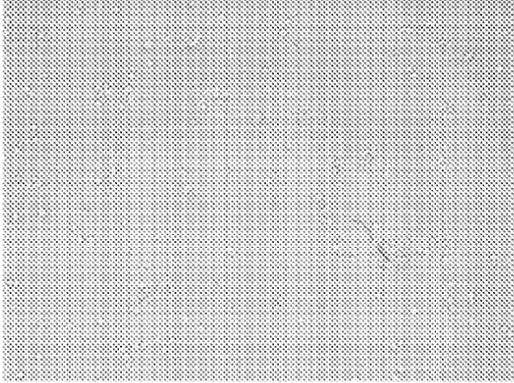


ADN : Mirus Trans IT de kit de transfección (2,5 µg:7,5 µl con 1,25 µl de reactivo Mojo en CHC a 1:3

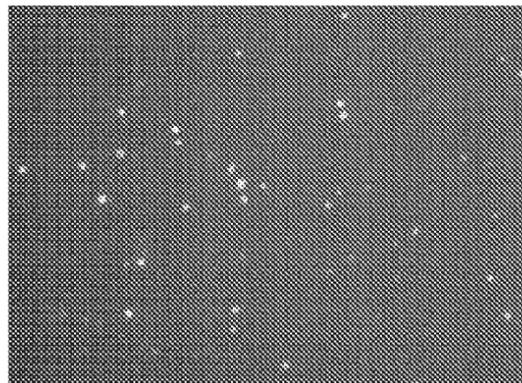
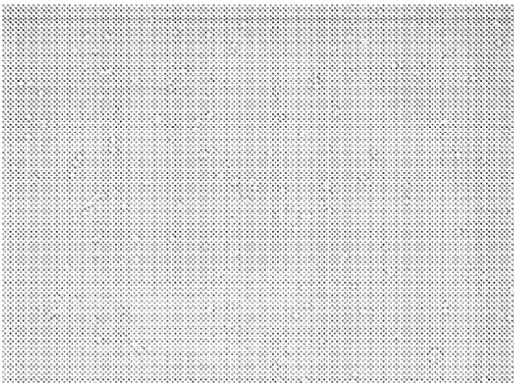


ADN : Mirus Trans IT 293 a 1:3 (2,5 µg : 7.5µl)

ADN : Mirus Trans IT X2 a 1:3 (2,5 µg : 7,5 µl)



ADN : Lipofectamina 3000 a 1:3 (2,5 µg : 7,5 µl)



ADN : Lipofectamina LTX a 1:3 (2,5 µg : 7,5 µl)

**A**

**B**

**FIGURA 20**