



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 122023023211-9 A2

(22) Data do Depósito: 28/04/2015

(43) Data da Publicação Nacional:
24/10/2017

(54) Título: MÉTODO DE FAZER EDIÇÕES DE GENES MULTIPLEX EM UMA CÉLULA DE VERTEBRADO OU DE EMBRIÃO PRIMÁRIO NÃO-HUMANO

(51) Int. Cl.: A01K 67/027.

(30) Prioridade Unionista: 28/04/2014 US 61/985,327.

(71) Depositante(es): RECOMBINETICS, INC..

(72) Inventor(es): SCOTT C. FAHRENKRUG; DANIEL F. CARLSON.

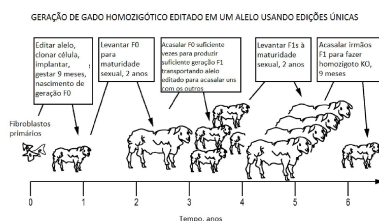
(86) Pedido PCT: PCT US2015027995 de 28/04/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/168125 de 05/11/2015

(85) Data da Fase Nacional: 06/11/2023

(62) Pedido original do dividido: BR112016024945-3 - 28/04/2015

(57) Resumo: MÉTODO DE FAZER EDIÇÕES DE GENES MULTIPLEX EM UMA CÉLULA DE VERTEBRADO OU DE EMBRIÃO PRIMÁRIO NÃO-HUMANO. Materiais e métodos para fazer edições de genes em células multiplex são apresentados. Outros métodos incluem animais e métodos para a preparo dos mesmos.



**MÉTODO DE FAZER EDIÇÕES DE GENES MULTIPLEX EM UMA
CÉLULA DE VERTEBRADO OU DE EMBRIÃO PRIMÁRIO NÃO-HUMANO**

(Dividido do BR 11 2016 024945 3, depositado em 28/04/2015)

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica a prioridade para o pedido provisório US No. 61/985.327 depositado em 28 de abril de 2014, que é aqui incorporado por referência.

CAMPO TÉCNICO

[002] O campo técnico diz respeito à edição de genes em múltiplos locais, múltiplas edições do gene em células de vertebrados, e suas utilizações.

FUNDAMENTOS

[003] As modificações genéticas às células, e para animais fabricados a partir de tais células, são úteis para alterar a expressão de genes. O campo da engenharia genética é muito ativo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] Seria muito útil fazer animais vertebrados grandes que, em uma única geração, tem múltiplas alterações ao seu código genético. Tal como aqui descrito é possível fazê-lo editando simultaneamente múltiplos genes em uma célula ou em um embrião. Múltiplos genes podem ser direcionados para a edição utilizando nucleases alvo e modelos de reparo dirigido por homologia (HDR) em células de vertebrados ou embriões. Estas células ou embriões podem ser utilizados para a pesquisa ou para fazer animais inteiros. Várias edições podem ser feitas em uma única geração que não podia ser feita de outra forma, por exemplo, por meio de cruzamento ou alterações de engenharia genética feita em série.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[005] Figura 1A descreve um processo para fazer animais homozigotos para dois nocautes usando edições individuais.

[006] Figura 1B descreve um processo hipotético de fazer animais com múltiplas edições fazendo de uma única edição de cada vez.

[007] Figura 2 descreve edições de gene multiplex utilizados para estabelecer fundadores na geração F0

[008] Figura 3. Edição de gene multiplex de suínos *RAG2* e *IL2Rγ*. Painel a) Análise Surveyor e RFLP para determinar a eficiência da junção de extremidade não homóloga (NHEJ) e reparo dirigido por homologia HDR em populações de células 3 dias após a transfecção. Painel b) análise RFLP de reparo dirigido por homologia em populações de células 11 dias após transfecção. Painel c) Percentagem de colônias positivas para HDR em *IL2Rγ*, *RAG2* ou ambos. As células foram plaqueadas a partir da população indicada por um "C" no painel a. Painel d) Análise de colônia a partir de células transfectadas com quantidades de TALEN mRNA de 2 e 1 µg para *IL2Rγ* e *RAG2* e modelo HDR a 1 µg para cada. Distribuição dos genótipos de colônias é mostrada abaixo.

[009] Figura 4. Edição de gene multiplex de suíno *APC* e *p53*. Painel a) Análise Surveyor e RFLP para determinar a eficiência da junção de extremidade não homóloga (NHEJ) e reparo dependente por homologia HDR em populações de células 3 dias após a transfecção. Painel b) análise RFLP de reparo dependente por homologia por populações de células 11 dias após transfecção. Os painéis c e d) Percentagem de colônias positivas derivadas da população de células indicadas

(indicado no painel a, "C" e "D") para HDR em *APC*, *p53* ou ambos. As colônias com 3 ou mais alelos de HDR estão listados abaixo.

[010] Figura 5. Efeito da concentração de oligonucleotídeo de modelo HDR em cinco genes multiplex de eficiência de HDR. Quantidades indicadas de TALEN mRNA dirigida a suínos *RAG2*, *IL2Rg*, *p53*, *APC* e *LDLR* foram co-transfectados para fibroblastos de suínos, juntamente com 2 uM (painel a) ou 1 uM (painel b) de cada modelo de HDR cognato. Por cento NHEJ e HDR foram medidos por ensaio de Surveyor e de RFLP.

[011] Figura 6 é um conjunto de dados multiplex de cinco genes que mostra gráficos de dados experimentais para o efeito de concentração de modelo de HDR de oligonucleotídeo em eficiência de HDR multiplex de cinco genes. Quantidades indicadas de TALEN mRNA dirigidas a suínos *RAG2*, *IL2Rg*, *p53*, *APC* e *LDLR* foram co-transfectadas para fibroblastos de suínos, juntamente com 2 uM (painel a) ou 1 uM (painel b) de cada modelo de HDR cognato. Por cento de NHEJ e HDR foram medidos por ensaio de Surveyor e de RFLP. Genótipos de colônias de HDR multiplex de 5-genes: genótipos de colônia foram avaliados por análise de RFLP. Painel a) Cada linha representa o genótipo de uma colônia em cada locus especificado. Três genótipos podem ser identificados; aqueles com o genótipo de RFLP esperado de HDR heterozigótica ou homozigótica, bem como aqueles com um fragmento de RFLP positivo, além de um segundo alelo que tem uma mudança visível em tamanho indicativo de uma inserção ou deleção (indel) do alelo. A percentagem de colônias com uma edição no locus especificado é indicado abaixo de cada coluna.

Painel b) A contagem do número de colônias editadas a 0 a 5 loci.

[012] Figura 7 é outro conjunto de dados multiplex de cinco genes que mostra gráficos de dados experimentais para um segundo experimento envolvendo o efeito da concentração do modelo de HDR de oligonucleotídeo na eficiência de genótipos de HDR de cinco genes multiplex. Genótipos de colônia de um segundo ensaio multiplex de 5-genes. Painel a) Cada linha representa o genótipo de uma colônia em cada locus especificado. Três genótipos podem ser identificados; aqueles com o genótipo de RFLP esperado HDR de HDR heterozigótico ou homozigótico, bem como aqueles com um fragmento de RFLP positivo, além de um segundo alelo que tem uma mudança visível em tamanho indicativa de uma inserção ou deleção (indel) do alelo. A percentagem de colônias com uma edição no locus especificado é indicado abaixo de cada coluna. Painel b) A contagem do número de colônias editada em 0 a 5 loci.

[013] Figura 8 é outro conjunto de dados de teste multiplex de cinco genes que mostra genótipos de colônia. Painel a) Cada linha representa o genótipo de uma colônia em cada locus especificado. Três genótipos podem ser identificados; aqueles com o genótipo de RFLP esperado de HDR heterozigótico ou homozigótico, bem como aqueles com um fragmento de RFLP positivo, além de um segundo alelo que tem uma mudança visível em tamanho indicativa de uma inserção ou deleção (indel) do alelo. A percentagem de colônias com uma edição no locus especificado é indicado abaixo de cada coluna. Painel b) A contagem do número de colônias editada em 0 a 5 loci.

[014] Figura 9 descreve um processo de fabricação de uma quimera de geração F0 com nucleases alvo que produzem um nocaute do gene desejado ou a escolha de alelos.

[015] Figura 10 descreve a criação de um animal de geração F0 com um fenótipo normal e progênie com uma insuficiência de crescimento (FTT) do fenótipo e genótipo.

[016] Figura 11 descreve um processo para fazer animais quiméricos gametas com a genética do embrião do doador.

[017] Figura 12 descreve a edição multiplex em três loci alvo de NKX-2, GATA4 e MESPl. Painei a) é uma representação esquemática do experimento, painei b) mostra o direcionamento dos genes, com a NKX2-5, GATA4, e MESPl listada como SEQ ID NOs: 1 a 3, respectivamente. Painei c) descreve os resultados de um ensaio para os experimentos. Sequências oligo para cada gene alvo. Novos nucleotídeos são representados por letras maiúsculas. A PTC é representada por letras de cor clara em caixas e o novo local HindIII RFLP é sublinhado.

[018] Figura 13 representa edição de gene multiplex utilizando uma combinação de TALENS e RGENs; ensaio de células transfectadas avaliadas por RFLP revelou HDR em ambos os locais.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[019] Processos para edições de genes multiplex são descritos. Genes múltiplos podem ser modificados em uma célula ou embrião que podem ser usados para a pesquisa ou para fazer animais inteiros. Outras formas de realização envolvem a complementação de perda de célula ou órgão por despovoamento seletivo de nichos hospedeiros. Estas

invenções proporcionam para rápida criação de animais para servir como modelos, comida, e como fontes de produtos celulares e acelulares para a indústria e medicina.

[020] A Figura 1A tem um cronograma que ilustra o porquê de ser necessário anos usando edições únicas para fazer gado que tem apenas dois alelos editados, com o tempo sendo de cerca de seis anos para o gado. Editado, neste contexto, refere-se à escolha do gene e sua alteração. Primeiro, um gene de interesse tem de ser editado, por exemplo, nocauteado (KO), em células somáticas cultivadas que são clonadas para criar um bezerro heterozigoto com um KO alvo. Os heterozigotos seriam elevados até a maturidade para reprodução, com cerca de 2 anos de idade para bovinos, para gerar bezerros heterozigotos machos e fêmeas de primeira geração (F1), que seriam criados uns com os outros para gerar um bezerro nocaute homozigoto (F2). A geração de homozigotos em relação a mutações múltiplas alvo utilizando uma abordagem convencional em bovinos seria impraticável. O número de anos requeridos e o número de animais necessários para fazer outras edições aumentam de uma forma aproximadamente exponencial, dependendo do esquema particular que é utilizado, como ilustrado na Figura 1B. Entre os vertebrados, mesmo os animais que têm maior número de filhos por geração e têm tempos gestacionais mais curtos do que o gado exigiriam tempos muito longos para conseguir múltiplas edições. Porcos, por exemplo, têm um maior número de filhos por acasalamento e um tempo de gestação que é aproximadamente a metade do gado, mas o tempo para fazer múltiplas edições pode exigir muitos anos. Além disso, esquemas que minimizam o tempo com endogamia agressiva podem não ser razoavelmente

possíveis para múltiplas edições. Além disso, a clonagem serial é indesejável de um processo e um ponto de vista de resultado, especialmente se os animais forem úteis como animais ou modelos laboratoriais.

[021] Uma oportunidade apresentada pela invenção é ilustrada na Figura 2, que mostra múltiplas edições sendo feitas em um animal de primeira geração (F0). Os embriões são preparados diretamente ou por clonagem com duas ou mais edições independentemente escolhidas para serem heterozigoto ou homozigoto e colocados em fêmeas de aluguel para gestar. Os animais resultantes são fundadores da geração F0. Uma pluralidade de embriões pode ser preparada e colocada em um ou mais substitutos para produzir progênie de ambos os sexos, ou técnicas bem conhecidas de divisão de embriões podem ser utilizadas para fazer uma pluralidade de embriões clonais. Animais, tais como porcos que tipicamente produzem uma ninhada com ambos os sexos podem ser cruzadas e propagadas.

[022] Múltiplos alelos podem ser interrompidos ou de outra forma editados como aqui descrito em uma célula ou embrião usando endonucleases alvo e reparo dirigido por homologia (HDR). Uma forma de realização é um método para fazer edições genéticas em uma célula de ou embrião de vertebrado em uma pluralidade de sítios de DNA cromossômico alvo compreendendo a introdução em uma célula ou embrião de vertebrado: uma primeira endonuclease alvo direcionada a um primeiro local de DNA cromossômico alvo e um primeiro modelo de reparo dirigido por homologia (HDR) homólogo à primeira sequência de local alvo; e uma segunda endonuclease direcionada a um segundo sítio de DNA cromossômico alvo e a um segundo modelo HDR homólogo à segunda sequência de local

alvo, com a primeira sequência de modelo de HDR substituindo a sequência de DNA cromossômico nativa no primeiro local alvo e a segunda sequência modelo de HDR substitui a sequência de DNA cromossômico nativa na segunda sequência do local alvo.

[023] Foi um resultado inesperado e surpreendente, e não previsível, saber que múltiplas edições tais como nocautes ou substituições poderiam ser obtidas. Um mecanismo teorizado é que há uma minoria de células que são receptivas a múltiplas edições porque estão em uma fase particular no ciclo celular. Quando expostas a endonucleases e modelos HDR, elas respondem prontamente. Uma teoria relacionada de operação é que o processo de modelagem de HDR se presta a múltiplas substituições porque a ativação de mecanismo de reparo celular para um local direcionado favorece a reparo, ou a modelagem de HDR, também em outros locais. Historicamente, o HDR tem sido um processo de baixa eficiência de modo que as múltiplas edições de HDR não foram aparentemente tentadas, observadas ou reconhecidas.

[024] Os resultados aqui apresentados mostram que uma quantidade excessiva ou muito pequena de endonuclease e/ou de modelo HDR pode ter um efeito negativo, o que pode ter confundido a investigação anterior nesta área. De fato, os inventores observaram que as endonucleases alvo podem ser concebidas e feitas corretamente mas, no entanto, fracassam porque são muito eficientes. Além disso, a população de células modificadas com êxito muitas vezes não melhora ao longo do tempo. Os artesãos que modificam células normalmente procuram longevidade da célula e modificação como um indicador de estabilidade e saúde para clonagem bem-sucedida

ou outros usos. Mas esta expectativa não foi muitas vezes útil nos processos de multiplexação aqui apresentados. Além disso, os inventores observaram que as eficiências de introgressão de recombinação homóloga (HR) são variáveis na abordagem multiplex em comparação com uma introgressão de único locus. Alguns loci eram muito sensíveis, mas outros tiveram grandes quedas em eficiência. Existe aparentemente interferência entre as endonucleases, mas o efeito líquido não pode ser explicado simplesmente, por exemplo, postulando que as endonucleases estão competindo pelo recurso comum.

[025] Existem várias técnicas bem conhecidas para inserir muitos genes aleatoriamente ou imprecisamente em uma pluralidade de localizações no DNA cromossômico, ou para fazer muitas edições aleatórias que quebram uma pluralidade de genes. Como é evidente, processos aleatórios ou imprecisos não vão ajudar o cientista que precisa editar uma pluralidade de genes especificamente direcionados para conseguir um efeito. Consequentemente, os processos HDR aqui descritos podem ser facilmente distinguidos pelas edições, e os organismos resultantes, sendo feitos apenas nos locais alvo pretendidos. Uma diferença é que, as formas de realização da edição de HDR da invenção podem ser realizadas sem inserção de cópias de genes adicionais e/ou livres de quebra de genes diferentes alvo pelas endonucleases. E as edições específicas são feitas em um local porque a sequência de modelo HDR não é copiada em locais sem homologia apropriada. As formas de realização incluem organismos e processos em que um alelo exógeno é copiado para o DNA cromossômico apenas no local do seu alelo cognato.

[026] Uma vantagem da edição baseada em HDR é que as edições podem ser escolhidas. Em contraste, outras tentativas, por processos de junção por extremidade não homóloga (NHEJ), podem fazer indels em múltiplas posições de modo que os indels cancelam-se mutuamente sem fazer um deslocamento do quadro. Esse problema torna-se significativo quando a multiplexação está envolvida. Mas o uso bem sucedido do HDR prevê que as edições podem ser feitas para assegurar que, se desejado, o gene alvo tenha um deslocamento do quadro pretendido. Além disso, a substituição alélica requer HDR e não pode ser conseguida por NHEJ, inserção guiada por vetores de ácidos nucleicos, inserções de transpóson e semelhantes. Além disso, a escolha do organismo que está livre de edições indesejadas aumenta ainda mais o grau de dificuldade.

[027] No entanto, acredita-se geralmente que as edições de multiplex tal como aqui descritas não tenham sido previamente atingidas em locais alvo em células ou animais relevantes para animais ou vertebrados grandes. É sabido que a clonagem de animais a partir de células de alta passagem cria animais com danos genéticos que não são úteis como fundadores F0 de modelos laboratoriais ou pecuária.

[028] E edição de genes é um processo estocástico; como resultado, o campo tem tradicionalmente enfatizado várias técnicas de rastreio para identificar as poucas percentagens de células que foram editadas com sucesso. Uma vez que se trata de um processo estocástico, a dificuldade de efetuar uma pluralidade de edições pode ser esperada pelo artesão para aumentar em um modo exponencial à medida que o número de edições pretendidas aumenta.

[029] Uma forma de realização da invenção proporciona processos para a criação de nocautes de genes multialvo ou outras edições em uma única célula ou embrião, um processo aqui referido como nocautes de genes multiplex ou edição. O termo gene alvo refere-se a um local de DNA cromossômico que é selecionado para ataque de endonuclease por concepção do sistema de endonuclease, por exemplo, um TALEN ou CRISPR. O termo nocaute, inativado e interrompido é utilizado indiferentemente neste documento para significar que o local alvo é alterado de modo que o produto de expressão genética é eliminado ou muito reduzido, de modo que a expressão do gene já não tem um impacto significativo sobre o animal como um todo. Estes termos são por vezes utilizados em outros locais para se referir à redução observável do papel de um gene sem essencialmente eliminar o seu papel.

[030] A edição genética, tal como este termo é aqui utilizado, refere-se à escolha de um gene e a sua alteração. As inserções aleatórias, o aprisionamento de genes e similares não são edição de genes. Exemplos de edições de genes são, em sítios alvo, nocautes de genes, adição de ácidos nucleicos, remoção de ácidos nucleicos, eliminação de toda a função, introgressão de um alelo, alteração hipermórfica, uma alteração hipomórfica e uma substituição de um ou mais alelos.

[031] Uma substituição de um alelo refere-se a um processo não meiótico de copiar um alelo sobre um alelo endógeno. O termo substituição de um alelo significa que a alteração é feita a partir do alelo nativo para o alelo exógeno sem indels ou outras alterações, exceto em alguns casos, substituições degeneradas. O termo substituição

degenerada significa que uma base em um códon é alterada para outra base sem alterar o aminoácido que é codificado. A substituição degenerada pode ser escolhida para estar em um exon ou em um intron. Um uso para uma substituição degenerada é criar um local de restrição para testar facilmente a presença da sequência introgressada. O alelo endógeno também é aqui referido como o alelo nativo. O termo gene é amplo e refere-se ao DNA cromossômico que é expresso para produzir um produto funcional. Os genes possuem alelos. Os genótipos são homozigotos se houver dois alelos idênticos em um locus particular e como heterozigoto se os dois alelos diferirem. Os alelos são formas alternativas de um gene (um membro de um par) que estão localizados em uma posição específica em um cromossomo específico. Os alelos determinam traços distintos. Os alelos têm diferenças de pares de bases (bp) em posições específicas em suas sequências de DNA (posições distintivas ou bp) que dão origem ao traço distinto e os distinguem um do outro, estas posições distintivas servem como marcadores alélicos. Os alelos são comumente descritos, e são aqui descritos, como sendo idênticos se tiverem as mesmas bases em posições distintivas; animais têm naturalmente certas variações em outros bp em outras posições. Os artesãos acomodam rotineiramente variações naturais ao comparar alelos. O termo exatamente idêntico aqui utilizado para significar absolutamente nenhuma diferença de bp ou indels em um alinhamento de DNA.

[032] Um teste semelhante para identidade alélica é alinhar o DNA cromossômico no organismo alterado com o DNA cromossômico do alelo exógeno tal como é reconhecido na natureza. O alelo exógeno terá um ou mais marcadores

alélicos. O alinhamento do DNA a montante e a jusante dos marcadores será idêntico para uma determinada distância. Dependendo do teste desejado, esta distância pode ser de, por exemplo, 10 a 4000 bp. Enquanto um modelo HDR pode ser esperado para criar uma sequência que tem exatamente idênticas, as bases de cada lado da área do modelo, naturalmente, irão ter alguma variação natural. Os artesãos rotineiramente distinguem alelos apesar da presença de variações naturais. Os artesãos irão imediatamente apreciar que todas as faixas e valores entre os limites explicitamente estabelecidos são contemplados, estando disponíveis quaisquer das seguintes distâncias como limite superior ou inferior: 15, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 4000.

[033] Os artesãos também são capazes de distinguir edições de genes de um alelo que são um resultado da edição de genes em oposição à reprodução sexual. É trivial quando o alelo é de outra espécie que não pode reproduzir sexualmente para misturar alelos. E muitas edições simplesmente não são encontradas na natureza. As edições podem ser também prontamente distinguidas quando os alelos são migrados de uma raça para a seguinte, mesmo quando se faz uma substituição que exatamente duplica um alelo exatamente encontrado naturalmente em outra raça. Os alelos estão estavelmente localizados no DNA a maior parte do tempo. Mas a meiose durante a formação de gametas faz com que os DNAs masculinos e femininos ocasionalmente troquem alelos, um evento chamado cruzamento. As frequências de cruzamento e os mapas genéticos foram amplamente estudados e desenvolvidos. No caso do gado, o pedigree de um animal pode

ser rastreado em grande detalhe para muitas gerações. Em genética, um centimorgan (cM, também chamado de unidade de mapa (m.u.)) é uma unidade que mede a ligação genética. É definida como a distância entre as posições cromossômicas (loci ou marcadores de loci) para as quais o número médio esperado de cruzamentos cromossômicos intervenientes em uma única geração é 0,01. Os genes que são próximos entre si têm uma chance menor de cruzamento quando comparado a genes que estão distantes uns dos outros no cromossomo. O cruzamento é um evento muito raro quando dois genes estão bem próximos um do outro no cromossomo. O cruzamento de um único alelo em relação aos seus dois alelos vizinhos é tão improvável que tal evento deve ser o produto da engenharia genética. Mesmo no caso em que estão envolvidos animais das mesmas raças, a substituição de alelos natural versus modificada pode ser prontamente determinada quando os pais são conhecidos. E a filiação pode ser determinada com um alto grau de precisão por genotipagem dos pais potenciais. A determinação dos pais é rotina nos rebanhos e nos seres humanos.

[034] As formas de realização incluem métodos de edição de genes multiplex que são simultâneos. O termo simultâneo está em contraste com um processo hipotético de tratamento de células múltiplas vezes para conseguir múltiplas edições, como em nocautes em série ou clonagem em série ou ciclos intermédios de reprodução animal. Simultaneamente significa estar presente a uma concentração útil ao mesmo tempo, por exemplo, estando presente em endonucleases alvo múltiplas. Os processos podem ser aplicados a zigotos e embriões para fazer organismos em que todas as células ou essencialmente todas as células têm

editado alelos ou nocautes. Essencialmente, todas as células, no contexto de um nocaute, por exemplo, refere-se a nocautear o gene fora de tantas células que o gene é, para fins práticos, ausente porque os seus produtos de gene são ineficazes para a função do organismo. Os processos modificam células e células em embriões, sobre um número mínimo de divisões celulares, preferencialmente cerca de zero a cerca de duas divisões. As formas de realização incluem um processo rápido ou um processo que ocorre ao longo de vários tempos ou números de divisões celulares é contemplado, por exemplo: de 0 a 20 replicações (divisões celulares). Os artesãos reconhecerão imediatamente que todos os valores e faixas indicadas são contemplados, por exemplo, cerca de 0 a cerca de 2 replicações, cerca de 0 a cerca de 3 replicações, não mais do que cerca de 4 replicações, desde cerca de 0 a cerca de 10 replicações, 10 a 17; menos de cerca de 7 dias, menos de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5 ou cerca de 6 dias, desde cerca de 0,5 a cerca de 18 dias, e semelhantes. O termo passagem baixa refere-se a células primárias que não sofreram mais do que cerca de 20 replicações.

[035] Por outro lado, os inventores demonstraram que, em um único embrião, os alelos maternos, paternos ou ambos podem ser editados em embriões bovino e porcino e que a edição do modelo de ambos os alelos pode portanto ocorrer utilizando HDR no embrião. Estas edições foram feitas no mesmo locus. Especificamente, a introgressão de cromátídeos irmãs foi detectada. Carlson et al., PNAS 43 (109):17382-17387, 2012.

[036] Exemplo 1, ver Figura 3, descreve experimentos que tentaram, com êxito, usar a edição de HDR para nocautear dois genes de uma só vez e, além disso, ser capaz de selecionar células que são homozigotos para ambos nocautes ou heterozigoto para cada nocaute. O termo selecionar é usado para se referir à capacidade de identificar e isolar as células para utilização posterior; não existiam genes repórteres expressíveis em qualquer parte do processo, o que é uma vantagem altamente significativa que distingue este processo de muitas outras abordagens. As células foram tratadas para introduzir uma primeira e uma segunda endonuclease alvo (cada uma sendo um par de TALENs) direcionada, respectivamente, a um primeiro gene (Gene de Ativação de Recombinação 2, RAG2) e a um segundo alvo de gene (Receptor de Interleucina 2, gama, IL2Rg ou ILR2γ). Os TALENs tinham de ser concebidos para atingir os locais em quantidades adequadas. O tratamento das células demorou menos de cinco minutos. Utilizou-se a eletroporação, mas existem muitos outros processos de introdução de proteínas ou de DNA adequados aqui descritos. As células foram então cultivadas de modo que formaram colônias individuais de células que descenderam cada uma de uma única célula tratada. As células das várias colônias foram testadas após 3 dias ou 11 dias. A taxa de nocaute de RAG2 foi cerca de seis vezes maior do que a taxa de nocaute de IL2Rg; aparentemente alguns genes são mais difíceis de nocaute do que outros. A eficiência de nocautear ambos os genes foi elevada e as células heterozigotos ou homozigotos para ambos os nocautes foram identificadas com sucesso. Significativamente, a dosagem de mRNA de TALEN e modelo de HDR tinham efeitos

específicos e não específicos. Um aumento no mRNA de TALEN para IL2Rg conduziu a um aumento em ambos NHEJ e HDR para IL2Rg enquanto que os níveis de NHEJ para RAG2 permaneceram inalterados. Um aumento em modelo HDR de IL2Rg reduziu o HDR no locus RAG2 sugerindo uma inibição não específica da reparo dirigido por homologia por escalada da concentração de oligonucleotídeo. Esta sensibilidade à dose, particularmente a estas baixas doses, tem possivelmente levado outros longe da perseguição de processos multiplex. As células do Exemplo 1 foram clonadas e, no momento do depósito, dois animais estão grávidas com embriões derivados dos mesmos.

[037] Exemplo 2, ver Figura 4, descreve experimentos que tiveram o mesmo objetivo de edição multiplex HDR para diferentes genes. O primeiro alvo genético foi Adenomatous polyposis coli (APC). O segundo alvo genético foi p53 (o gene TP53). Células homozigotas tanto para nocautes quanto para células heterozigotas para ambos os nocautes foram detectadas e isoladas.

[038] Exemplo 3, ver Figuras 5 a 8, descreve edição multiplex HDR para nocaute de 2 a 5 genes. Houve três experimentos, com o número de colônias de células testadas para genótipo variando de 72 a 192 para cada experimento. As células foram tratadas para múltiplos nocaute de várias combinações os genes APC, p53, RAG2, Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDLR), IL2Rg, Receptor de Kisspeptina (KISSR ou GPR54), e Fator de Iniciação de Tradução Eucariótica 4GI (EIF4GI). O gene LDLR foi consistentemente menos passível de modificação do que os outros genes. Como é evidente a partir dos resultados, os alelos múltiplos podem ser interrompidos simultaneamente utilizando a reparo

dirigido por homologia (HDR) especificada por TALEN. Cinco pares de TALEN que cada um resultou em mais de 20% de HDR/local e seus modelos de HDR cognatos foram simultaneamente cotransfectados em três combinações (Tabela A). Uma proporção de colônias de cada repetição foram positivas para eventos de HDR em pelo menos quatro genes e duas colônias de replicado-A tinham eventos de HDR em todos os cinco genes. Embora a formação indel simultânea em cinco genes tenha sido demonstrada por NHEJ estimulado por Cas9/CRISPR em células ES de ratinho, a modificação precisa de 5 genes (até 7 alelos) por HDR estimulado por nuclease alvo é inesperada, surpreendente e sem rival. Quando os TALENs da replicado foram substituídos Cas9/CRISPRs (os vetores foram introduzidos nas células para expressar), os níveis de modificação estavam abaixo da detecção (dados não apresentados); no entanto, outros dados apontam para multiplex RGEN, por exemplo, Exemplo 9 abaixo. Quatro genes foram verificados a serem editados em todas os experimentos e cinco genes em um experimento.

[039] A velocidade e eficiência deste processo se presta a escalonamento de modo que o nocaute multiplex de mais de 5 genes é realizável sem alterar a natureza do processo. Com referência à Tabela A, foram testadas cerca de 72 a 192 células; agora que este processo foi estabelecido, não é irracional aumentar o número de testes para um número muito maior de células, de modo que se pode esperar um multiplex de um número maior de genes/alelos. Um certo número de genes ou alelos multiplex podem ser de 2 a 25; artesãos irão apreciar imediatamente que todos intervalos e valores entre os limites explicitamente estabelecidos são

contemplados, com qualquer um dos seguintes está disponível como um limite superior ou inferior em combinação uns com os outros: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 25.

Tabela A: HDR Multiplex em fibroblastos de suínos

Genes editados	Rep A # (por cento)	Rep B # (por cento)	Rep C # (por cento)
5	2 (3)	0	0
4	0	5 (5)	4 (2)
3	3 (4)	7 (7)	14 (7)
2	12 (17)	23 (24)	41 (21)
1	24 (33)	29 (30)	47 (24)
1+	41 (57)	63 (66)	106 (55)

Genes segmentados em cada repetição:

A. APC, LDLR, RAG2, IL2Rg, p53.

B. APC, LDLR, RAG2, KISSR, EIF4G1

C. APC, LDLR, RAG2, KISSR, DMD

[040] Como é evidente, as células e embriões com nocautes multiplex são formas de realização da invenção, assim como animais feitos deste modo.

[041] O Exemplo 4 descreve alguns processos detalhados para o preparo de vários animais e refere-se a certos genes a título de exemplo. O Exemplo 5 descreve exemplos de concepção e produção de CRISPR/Cas9.

[042] O Exemplo 6 proporciona outros exemplos de edição de genes multiplex com nucleases alvo que conduzem processos HDR. Proteína 4 de ligação a GATA (GATA4); proteína Homeobox NKX2-5 (NKX2-5) e Proteína 1 Mesoderma Posterior (MESP1) foram simultaneamente alvo de TALENs e HDR modelos para direcionar mutações de deslocamento do quadro e códons

de parada prematuros em cada gene. O objetivo foi criar nocautes bialélicos para cada gene para uso em estudos de complementação. O processo era cerca de 0,5% eficiente, uma vez que 2 clones tinham o HDR bialélica pretendido em cada gene. Os dados genes nocaute sozinho ou em combinação genes irão causar uma falha para prosperar genótipo e início embrionário de letalidade sem complementação. Os artesãos irão apreciar que nocaute destes genes individualmente e cruzamento de heterozigotos para obter nocautes triplos (cerca de 1/66 de chance) para FTT e estudos de complementação não é viável em gado.

[043] Exemplo 7 fornece dados que TALENs e Cas9/CRISPR podem ser misturados para realizar a edição multiplex de genes. Alguns genes/alelos são mais facilmente alvo de um TALEN, ou Cas9/CRISPR e que a situação pode surgir que a multiplexação deve ser feita com uma combinação dessas ferramentas. Neste exemplo, o Fator de Iniciação de Tradução Eucariótica 4GI (EIF4GI) foi alvo de TALENs e o gene p65 (RELA) foi alvo de Cas9/ CRISPR. As células foram analisadas por ensaio de RFLP, indicativo de eventos de HDR e HDR foi evidente em ambos os locais. Assim, TALEN e RGEN podem ser utilizados conjuntamente ou separadamente para Combinações de multiplexação incluindo, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 TALENs com 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 reagentes RGEN, em qualquer combinação.

Quimeras

[044] As quimeras podem ser feitas preparando um blastocisto hospedeiro e adicionando uma célula doadora a partir de um animal doador. O animal resultante será um quimero que tem células originárias tanto do hospedeiro como

do dador. Alguns genes são necessários para que o embrião crie certos tipos de células e linhagens celulares. Quando um tal gene é nocauteado nas células hospedeiras, a introdução de uma célula doadora que tem o gene em falta pode resultar naquelas células e linhagens de células sendo restauradas para o embrião hospedeiro; as células restauradas têm o genótipo doador. Tal processo é referido como um processo de complementação.

[045] Matsunari et al., PNAS 110:4557-4562, 2013, descreveram um processo de complementação para fazer um pâncreas de porco derivado doador. Eles fizeram um blastocisto de porco hospedeiro que foi alterado para evitar a formação de um pâncreas funcional. Eles fizeram o blastocisto hospedeiro por clonagem de células somáticas. A célula somática foi modificada para sobre-expressar Hes1 sob o promotor de Pdx1 (homeobox 1 pancreático e duodenal), que era conhecido por inibir o desenvolvimento pancreático. As células doadoras adicionadas ao blastocisto hospedeiro não tinham esta modificação; as células doadoras forneceram as linhagens de células necessárias para produzir o pâncreas. Elas já demonstraram em outro lugar que órgãos funcionais podem ser gerados a partir de células tronco pluripotentes (PSCs) in vivo por complementação de blastocistos em embriões de camundongos com deficiência de organogênese. Eles propuseram pesquisas futuras usando células tronco pluripotentes xenogênicas (PSCs), incluindo PSCs induzidas por humanos. De fato, o xenotransplante tem sido considerado uma solução potencial para a escassez de órgãos/tecidos há mais de 40 anos. O fato de que nenhum gene foi nocauteado para desativar a formação do pâncreas é significativo.

[046] O nocaute mesmo um gene em um grande vertebrado é um investimento significativo de recursos utilizando processos convencionais. Em contraste, a sobre-expressão de um produto de genes em uma célula é prontamente conseguida utilizando o estado atual da técnica, por exemplo, com um plasmídeo ou um vetor que coloca múltiplas cópias de cassete de genes no genoma. Adicionar a expressão de um gene é mais fácil do que alvejar um gene e nocautear o mesmo para fora. Acredita-se que a capacidade de prevenir a organogênese por sobre-expressão de um produto de genes seja incomum neste momento. De fato, limitações na capacidade de geneticamente modificar genomas animais grandes podem ser significativas. No entanto, o porco é o animal doador preferido para o xenotransplante devido à sua semelhança de tamanho e fisiologia com os seres humanos, bem como a sua elevada taxa de fecundidade e crescimento.

[047] A Figura 9 ilustra um processo multiplex utilizado aqui para fazer nocautes de genes ou outras edições de gene como aplicado no contexto de quimeras. Células somáticas primárias de baixa passagem são feitas com nocautes de genes. As células com exatamente a distribuição desejada de heterozigosidade e homozigosidade para os nocautes são isoladas. Estas células são utilizadas na clonagem para fazer um embrião que é deixado desenvolver-se como um blastocisto. O termo blastocisto é aqui amplamente utilizado para se referir a embriões de duas células até cerca de três semanas. O termo embrião é usado amplamente para se referir a animais de zigoto ao nascimento da vida. Um embrião doador é estabelecido e usado como uma fonte de células doadoras que fornecem genes para preencher o nicho criado pelos nocautes.

As células doadoras são introduzidas no blastocisto hospedeiro e reproduzem-se com as células hospedeiras para formar uma quimera possuindo tanto células hospedeiras quanto doadoras. O embrião é transferido para uma fêmea de aluguel e gestado. A progênie da quimera possui genótipos hospedeiros quando as células hospedeiras formam as gametas. As quimeras têm o seu sexo determinado pelo seu blastocisto hospedeiro.

[048] A Figura 10 ilustra um processo de complementação de insuficiência de crescimento do fenótipo (FTT). FTT refere-se a animais que não são esperados viver até uma idade de maturidade sexual. Um embrião hospedeiro é fornecido com um genótipo e fenótipo FTT. Processos multiplex são ideais, porque os FTTs disponíveis por nocaute de apenas um gene são limitados e não são conhecidos por alguns órgãos e tecidos. As células doadoras fornecem os genes insuficientes no FTT e fornecem os tipos de células ineficientes. O embrião pode ser um animal vertebrado grande e os nocautes podem ser multiplex, por exemplo, 2 a 25 genes. Além disso, endonucleases alvo podem ser utilizadas para se conseguir um nocaute. Em uma forma de realização de imunodeficiência, um nocaute IL2Rg-/y RAG2-/- é o FTT porque o hospedeiro é essencialmente insuficiente a funções imunes. Mas as células doadoras não têm esses genes insuficientes e a quimera resultante tem um fenótipo essencialmente normal para fins de ser capaz de levantar e manter o animal. Mas a progênie tem o fenótipo FTT. Os animais podem assim ser mantidos e os animais FTT produzidos convenientemente. As quimeras podem ser qualquer combinação de heterozigotos e homozigotos para os nocautes. Processos para a produção de

quimera são assim descritos que são animais de geração F0 que produzem ineficiência a fenótipos de crescimento (FTT) quando outros processos requerem uma geração adicional, ou mais.

[049] A quimera normalmente transmite a genética das células hospedeiras. Descrevem-se aqui, no entanto, quimeras alternativas que passam a genética de células doadoras para a sua progênie e não para a genética de células hospedeiras. Acontece que mudar a herança genética pode criar algumas oportunidades úteis. Com referência à Figura 11, é descrito um embrião marcado como um hospedeiro G-. O embrião foi preparado com gametas não funcionais. Um blastocisto doador é preparado e utilizado como uma fonte de células doadoras. As células doadoras fornecem os genes e linhagens celulares que são necessários para produzir gametas doadores. A quimera resultante tem os gametas das células doadoras e cria progênie com genética de células doadoras. Na ilustração, o embrião hospedeiro é um touro Brahman macho. As células doadoras são de um touro de dois músculos. A quimera tem um fenótipo de touro Brahman, mas sua progênie é de dois músculos. O hospedeiro e os doadores podem ser de raças iguais ou diferentes ou de espécies iguais ou diferentes. O hospedeiro foi preparado para ser estéril, o que significa que ele não pode reproduzir sexualmente. Alguns animais estéreis podem ser utilizados para produzir gametas que não são funcionais, por exemplo, espermatozoides imóveis, ou não produzem gametas em tudo, por exemplo, com gametogênese precoce sendo interrompida. As células doadoras podem ser, por exemplo, células do tipo selvagem, células de raças de

animais que tem traços desejáveis ou células geneticamente modificadas.

[050] As formas de realização da invenção incluem animais estéreis quiméricos, tais como gado quimérico, que têm uma modificação genética a um cromossoma que impede a gametogênese ou a espermatogênese. O cromossomo pode ser um cromossomo X, um cromossomo Y ou um autossomo. A modificação pode incluir uma interrupção de um gene existente. A interrupção pode ser criada alterando um gene cromossômico existente para que não possa ser expresso, ou por geneticamente expressando fatores que irão inibir a transcrição ou tradução de um gene. O termo gametogênese significa a produção de células sexuais haploides (óvulos e espermatozoides) que cada uma carrega metade da complementação genética dos pais da linha de células germinativas de cada progenitor. A produção de espermatozoides é a espermatogênese. A fusão de espermatozoides e óvulos durante a fertilização resulta em uma célula zigoto que possui um genoma diploide. O termo célula gametogênica refere-se a um progenitor de um óvulo ou esperma, tipicamente uma célula germinal ou uma célula espermatogonial. Uma forma de realização é um nocaute de células tronco espermatogônicas (SSC) no hospedeiro. O animal pode ser feito com células doadoras que têm genética desejável e fornece células SSC que produzem gametas com o genótipo doador. Alguns genes são interrompidos em combinação para produzir um ou mais efeitos que causam infertilidade, por exemplo, combinações de: Acr/Hl.1/Smcp, Acr/Tnp2/Smcp, Tnp2/Hl.1/Smcp, Acr/Hlt/Smcp, Tnp2/Hlt/Smcp (Nayernia K, Drabent B, Meinhardt A, Adham IM, Schwandt I,

Muller C, Sancken U, Kleene KC, Engel W Os nocautes triplos revelam interações de genes que afetam a fertilidade de ratinhos machos. Mol. Reprod. Dev 70(4): 406-16, 2005). As formas de realização incluem uma primeira linha de animais com um nocaute de um primeiro gene ou genes e uma segunda linha de animais com um nocaute de um segundo gene ou genes de modo que a progênie masculina das linhas são inférteis.

[051] O uso da engenharia genética para criar grandes vertebrados geneticamente modificados irá acelerar a criação de animais com características desejáveis. A pecuária tradicional é um processo de consumo caro e tempo que envolve a seleção cuidadosa de traços genéticos e longas esperas para reprodução geracional. Mesmo com a seleção cuidadosa de traços, as variações da reprodução sexual representam um desafio considerável para cultivar e transmitir combinações de traços desejáveis. Mas a criação de quimeras que transmitem os traços dos doadores criam métodos de reprodução animal que permitem a rápida disseminação de traços genéticos desejáveis, bem como para a proteção do controle proprietário dos traços. As formas de realização incluem a produção de animais geneticamente e genomicamente estéreis que podem servir como hospedeiros para material genético do doador. A relação sexual do hospedeiro levará à reprodução do material genético do doador. Um grupo de animais geneticamente estéreis pode ser usado para disseminar genes idênticos a partir de um único doador por reprodução sexual de modo que muitos progênes de doadores podem ser rapidamente gerados. As formas de realização incluem animais que são modificados para produzir apenas um gênero de animal de modo que os

usuários que recebem os animais não serão capazes de reproduzir facilmente os animais com os traços.

[052] As formas de realização incluem fazer uma modificação genética em células ou embriões para inativar um gene ou pluralidade de genes seletivos para a atividade gametogênese ou espermatozoides. Um processo de modificação genética envolve a introdução de uma nuclease alvo, por exemplo, um Cas9/CRISPR ou mRNA para um par TALEN que se liga especificamente ao gene. Um animal é clonado a partir das células ou o embrião modificado é criado diretamente em uma mãe de aluguel. O animal pode ser um animal de gado ou outro animal. Gametogênese pode ser bloqueada em uma fase precoce. Ou atividade de espermatozoides pode ser interrompida que é essencial para a fertilidade, mas não é de outro modo essencial para o animal. O animal é, portanto, estéril porque não pode reproduzir sexualmente: no entanto, ARTs podem ser usados para criar progênie do esperma modificado. É selecionado um animal doador que tenha características genéticas desejáveis (como um resultado da reprodução e/ou engenharia genética).

Estabelecimento rápido de linhas de animais fundadores da geração F0 com dois ou mais nocautes

[053] Com, dois, três ou mais genes multiplex (2 a 25) podem ser simultaneamente nocauteados para produzir uma geração de F0 com a combinação desejada de alelos. Se a homozigossidade para todos os nocautes cria um FTT, então uma opção é fazer com que os homozigotos fundadores para todos os nocautes exceto para um - ou qualquer que seja a heterozigossidade mínima deve ser para essa situação. O gene de um heterozigoto pode permitir um fenótipo não FTT.

Alternativamente, os nocautes multiplex podem ser usados em combinação com a complementação para fazer o crescimento da quimera que têm progeneritura FTT. Este processo pode eliminar gerações na criação de um animal nocaute múltiplo.

[054] Em ambos os casos, as vantagens são grandes e movem muitos processos para o realmente realizável. Produção de animais com nocautes de dois loci por reprodução convencional é de custo proibitivo, uma vez que apenas 6% dos descendentes teriam o fenótipo desejado na geração F2 (Tabela B). Por outro lado, a abordagem multiplex permite a produção do genótipo desejado na geração F0, uma grande vantagem em relação aos nocautes convencionais e reprodução. Deve ser ressaltado que a economia de tempo e animais não é teórica: é um avanço que faz alguns tipos de modificações possíveis porque o sucesso é esperado em vez de falha. Além disso, para continuar o exemplo, a reprodução entre um ou dois pais quiméricos de RG-KO aumentaria significativamente a taxa de produção de progeneritura RG-KO para 25 e 100 por cento respectivamente (Tabela B).

Tabela B: Vantagem da reprodução de porcos quiméricos.

Macho		Fêmea	%RG-KO
<i>Chimera-IL2Rg^{y/-}; RAG2^{-/-}</i>	x	<i>Chimera-IL2Rg^{-/-}; RAG2^{-/-}</i>	100%
<i>Chimera-IL2Rg^{y/-}; RAG2^{-/-}</i>	x	<i>IL2Rg^{+/-}; RAG2^{+/-}</i>	25%
<i>IL2Rg^{y/-}; RAG2^{+/-}</i>	x	<i>IL2Rg^{+/-}; RAG2^{+/-}</i>	6,3%

Animais imunodeficientes

[055] Um grupo de formas de realização refere-se a suínos imunodeficientes ou a outros animais da pecuária e a processos de produção dos mesmos. Estas formas de realização são exemplos de edições multiplex, por exemplo, nocautes,

que aproveitam a oportunidade para gerir a seleção genótipos de nocaute homozigotos e heterozigotos. Estes demonstram o poder do multiplex para estabelecer rapidamente linhas fundadoras. Eles também incluem outros aspectos das invenções que envolvem fazer quimeras.

[056] O porco é o modelo animal mais relevante, não primata, que imita o tamanho e fisiologia dos humanos. Infelizmente, os porcos totalmente imunodeficientes não estão amplamente disponíveis porque (1) são necessários nocautes de genes múltiplos (KOs), (2) intercruzamento para criar animais nulos multi-lócus é extremamente dispendioso e dependendo do número de Kos pode ser possível, e (3) apenas instalações em pequena escala sem germes são disponíveis para suínos. Aqui, as formas de realização incluem animais vertebrados grandes com um nocaute de ambos *RAG2* e *IL2Rg* (isto é, RG-KO). O termo vertebrado grande refere-se a símios, gado, cães e gatos. O termo gado refere-se a animais geralmente criados para alimentação, tais como bovinos, ovelhas, cabras, aves (frango, peru), porcos, búfalos e peixes. Os genes podem ser nocauteados de células somáticas que são então usadas para clonagem para produzir um animal inteiro. Alternativamente, os embriões podem ser tratados para nocaute dos genes, com os animais sendo derivados diretamente dos embriões. A plataforma multiplex de alvo de genes pode simultaneamente interromper o desenvolvimento de células T, B e NK no porco. Assim, os animais feitos sem tais células podem ser feitos diretamente com os métodos aqui descritos, como fundadores de F0, mas o fenótipo é FTT.

Alvos agrícolas para edições multiplex

[057] A edição de genomas de animais alimentares pode ser muito acelerada pela edição de vários loci ao mesmo tempo, salvando gerações de reprodução de animais que seriam necessárias para reunir alelos que são gerados em vez um de cada vez. Além disso, alguns traços agrícolas são complexos, o que significa que eles são manifestos como resultado da influência de alelos em mais de um gene (de 2 para centenas). Por exemplo, polimorfismos em DGAT, ABCG2 e um polimorfismo no cromossomo 18 representam, em conjunto, grande parte da variação do Mérito Lácteo Líquido no gado leiteiro. Células ou embriões de gado podem ser submetidas à edição multiplex de numerosos genes, incluindo vários alvos da agricultura: um ou mais de ACAN, AMELY, BLG, BMP 1B (FecB), DAZL, DGAT, Eif4GI, GDF8, Locus de Horn-poll, IGF2, CWC15, KissR/GRP54, OFD1Y, p65, PRLR, Prmd14, PRNP, Rosa, Socs2, SRY, ZFY, lactoglobulina, CLPG.

Metas de modelagem da doença para multiplexação:

[058] Alguns traços, como o câncer, são causados na base de mutações em múltiplos genes (ver APC/p53). Além disso, numerosos traços da doença são denominados traços Complexos que se manifesta como um resultado da influência de alelos em mais de um gene. Por exemplo, diabetes, metabolismo, doenças cardíacas e doenças neurológicas são consideradas traços complexos. As formas de realização incluem modelos de animais que são heterozigotos e homozigotos para alelos individuais, ou em combinação com alelos em outros genes, em diferentes combinações. Por exemplo, diabetes de início maduro de loci em jovem (MODY) causa diabetes individualmente e aditivamente, incluindo; MODY 1 (HNF4 α), MODY 2 (GCK), MODY3 (HNF1 α), MODY4 (Pdx1),

MODY 5 (HNF-1 β), MODY 6 (diferenciação eurogênica 1), MODY 7 (KLF11), MODY 8 (CEL), MODY 9 (PAX4), MODY 10 (INS), MODY 11 (BLK). Células de gado ou embriões podem ser submetidas à edição multiplex de numerosos genes para modelação animal, incluindo várias metas de modelagem da doença: APC, ApoE, DMD, GHRHR, HR, HSD11B2, LDLR, NF1, NPPA, NR3C2, p53, PKD1, Rbm20, SCNN1G, tP53, DAZL, FAH, HBB, IL2RG, PDX1, PITX3, Runx1, RAG2, GGTA. As formas de realização incluem células, embriões e animais com um ou mais dos alvos acima sendo editados, por exemplo, KO.

[059] Os genes de uma espécie possuem consistentemente ortólogos em outras espécies. Genes humanos e de ratinhos têm consistentemente ortólogos em gado, particularmente entre vacas, porcos, ovelhas, cabras, frango e coelhos. Ortólogos genéticos entre estas espécies e peixes é muitas vezes consistente, dependendo da função do gene. Os biólogos estão familiarizados com processos para encontrar ortólogos de genes de modo que os genes possam ser aqui descritos em termos de uma das espécies sem listar ortólogos das outras espécies. As formas de realização que descrevem a ruptura de um gene incluem assim a ruptura de ortólogos que têm os mesmos nomes ou nomes diferentes em outras espécies. Existem bases de dados genéticas gerais, bem como bases de dados especializadas na identificação de ortólogos genéticos. Além disso, os artesãos estão familiarizados com as abreviaturas comumente utilizadas para genes e utilizam o contexto para identificar a que gene está a ser referido no caso de haver mais do que uma abreviatura para um gene ou dois genes são referidos pela mesma abreviatura.

[060] As células tronco espermatogônicas oferecem um segundo método de modificação genética do gado. A modificação genética ou a edição de genes podem ser executadas in vitro em células tronco espermatogonais isoladas de testículos de doadores. As células modificadas são transplantadas para testículos empobrecidos por células germinais de um receptor. Células tronco espermatogônicas implantadas produzem esperma que carregam a(s) modificação (ões) genética(s) que pode(m) ser usada(s) para reprodução através de inseminação artificial ou fertilização in vitro (FIV) para a obtenção de animais fundadores.

Complementação da célula nullomórfica ou perda de órgãos por despovoamento seletivo de nichos de hospedeiros.

[061] Edição multiplex pode ser usada para propositadamente ablar células ou órgãos de um embrião específico ou nicho de animal, criando um ambiente conducente a melhor integração, proliferação e diferenciação do doador de célula, aumentando sua contribuição por complementação de células, tecidos ou órgãos ortólogos no embrião, feto ou animal. O animal com o nicho vazio é um portador de deficiência porque foi criado para ter uma deficiência que pode ser preenchida por células do doador e genes. Exemplos específicos incluem a eliminação do receptor e o resgate do doador de linhagens celulares gametogênicas (DAZL, VASA, MIWI, PIWI, e assim por diante).

[062] Em outra forma de realização, a edição de genes multiplex pode ser utilizada para induzir alopecia congênita, proporcionando oportunidade para que as células derivadas do doador participem na foliculogênese do cabelo. Os genes considerados para a edição de genes multiplex para

causar alopecia incluem aqueles identificados em OMIM e na base de dados de Ontologia de Fenótipo Humano; DCAF17, VDR, PNPLA1, HRAS, Telomerase-vert, DSP, SNRPE, RPL21, LAMA3, UROD, EDAR, OFD1, PEX7, COL3A1, ALOX12B, HLCS, NIPAL4, CERS3, ANTXR1, B3GALT6, DSG4, UBR1, CTC1, MBTPS2, UROS, ABHD5, NOPIO, ALMS1, LAMB3, EOGT, SAT1, RBPJ, ARHGAP31, ACVR1, IKBKG, LPAR6, HR, ATR, HTRA1, AIRE, BCSIL, MCCC2, DKC1, PORCN, EBP, SLITRK1, BTK, DOCK6, APCDD1, ZIP4, CASR, TERT, EDARADD, ATP6VOA2, PVRL1, MGP, KRT85, RAG2, RAG-1, ROR2, CLAUDIN1, ABCA12, SLA-DRA1, B4GALT7, COL7A1, NHP2, GNA11, WNT5A, USB1, LMNA, EPS8L3, NSDHL, TRPV3, KRAS, TINF2, TGMI, DCLREIC, PKPI, WRAP53, KDM5C, ECM1, TP63, KRT14, RIPK4. O quimerismo com células doadoras com potencial foliculogênico pode ser utilizado para o crescimento de folículos pilosos humanos. A ablação de órgãos ou tecidos em suínos ou outros vertebrados e crescimento de órgãos ou tecidos de origens humanas é particularmente útil como fonte de órgãos ou tecidos médicos.

[063] Outros objetivos de complementação para a multiplexação são: PRKDC, BCL11a, BMII, CCR5, CXCR4, DKK1, ETV2, FLII, FLKI, GATA2, GATA4, HHEX, KIT, LMX1A, MYF5, MYOD1, MYOG, NKX2-5, NR4A2, PAX3, PDX1, PITX3, Runx1, RAG2, GOTA, HR, HAND1, TBX5.

[064] As formas de realização incluem direcionar uma, duas ou mais (2 a 25) das metas acima em uma abordagem multiplex ou por outras abordagens.

Genes editados

[065] Os métodos e invenções aqui descritos com respeito a alvos particulares e endonucleases alvo são amplamente aplicáveis. Os inventores prepararam células de

gado primário adequadas para clonagem com edições com todos dos seguintes genes.

Tabela C: Células de gado primário adequadas para clonagem, produzidas em fibroblastos suínos e/ou bovinos por endonucleases alvo (TALENs) e nocaute por HDR.		
ID do gene	Nome do gene	Espécies S: Suíno B: Bovino
ETV2	Ets Variant 2	s
PDX1	homeobox 1 pancreático e duodenal	s
TBX4	Fator de transcrição T-box TBX4	s
102	Inibidor de proteína de ligação de DNA	s
SOX2	SRY (região de determinação do sexo Y)-box 2	s
TIF1/NKX2-1	Fator de transcrição da tireoide 1/NK2 homeobox 1	s
MESP1	Homólogo da mesoderma posterior 1	s
GATA4	Proteína de ligação GATA 4	s
NKX2-5	NK2 homeobox 5	s
FAH	Fumarilacetoacetato Hidrolase	s
PRKDC	Proteína quinase, DNA-ativado, polipeptídeo catalítico	s
RUNX1	Fator de transcrição 1 relacionado com Runt	s
FLI1	Fator de transcrição 1 de integração de leucemia Friend	s
PITX3	Pituitária homeobox 3	s
LMX1A	Fator de transcrição 1 de LIM homeobox, alpha	s
DKK1	Proteína 1 relacionada Dickkopf	s

NR4A2/NURR1	Subfamília 4 do receptor nuclear, grupo A, membro 2/ receptor nuclear relacionado a proteína 1	s
FLK1	Quinase 1 do fígado fetal 1	s
HHEX1	Proteína homeobox hematopoieticamente expressa	s
BCL11A	Linfoma célula-B/leucemia 11A	s
RAG2	Gene de ativação por recombinação 2	s
RAG1	Gene de ativação por recombinação 1	s
IL2RG	Receptor de interleucina 2, gamma	s
c-KIT/SCFR	Receptor de fator de crescimento de célula estaminal/mastro	s
BMI1	Oncogene de dedo do anel polycomb	s
HANDII	Proteína 2 expressa de derivados do coração e da crista neural	s
TBX5	Fator de transcrição 5 T-box 5	s
GATA2	Proteína de ligação 2 GATA	s
DAZL	Suprimido em tipo AZoospermia	S, B
OLIG1	Fator de transcrição 1 de oligodendrócito	s
OLIG2	Fator de transcrição 2 de oligodendrócito	s

Animais geneticamente modificados

[066] Podem ser feitos animais que sejam mono-alélicos ou bi-alélicos para uma modificação cromossômica, utilizando métodos que deixem um marcador geneticamente expressível no local, permitam a sua reprodução fora de um animal ou por métodos que não colocam tal marcador no animal. Por exemplo, os inventores utilizaram métodos de recombinação dependente homóloga (HDR) para fazer alterações ou inserção de genes exógenos em cromossomos de animais. Ferramentas tais como

TALENs e proteínas de fusão de recombinase, bem como métodos convencionais, são discutidas em outro local aqui. Alguns dos dados experimentais que suportam as modificações genéticas aqui descritas são resumidos como se segue. Os inventores demonstraram anteriormente eficiência de clonagem excepcional quando clonada a partir de populações poligênicas de células modificadas, e defendeu esta abordagem para evitar a variação na eficiência de clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) para colônias isoladas (Carlson et al., 2011). Adicionalmente, no entanto, a modificação do genoma mediada por TALEN, assim como a modificação por moléculas de fusão de recombinases, proporciona para uma alteração bi-alélica a ser realizada em uma única geração. Por exemplo, um animal homozigótico para um gene nocaute pode ser feito por SCNT e sem endogamia para produzir homozigose. A duração da gestação e a maturação da idade de reprodução para o gado tais como suínos e bovinos é uma barreira significativa à pesquisa e à produção. Por exemplo, a geração de um nocaute homozigótico a partir de células mutantes heterozigóticas (ambos os sexos) por clonagem e reprodução necessitaria de 16 e 30 meses para suínos e bovinos respectivamente. Alguns alegadamente reduziram este fardo com ciclos sequenciais de modificação genética e SCNT (Kuroiwa et al., 2004) no entanto, isso é tanto tecnicamente desafiador quanto de custo proibitivo, além disso, há muitas razões para evitar a clonagem serial para fazer animais F0 que são realmente úteis para modelos de laboratório de grandes vertebrados ou gado. A capacidade de gerar rotineiramente células KO bi-alélicas antes da SCNT é um avanço significativo na engenharia genética de animais

grandes. Nocaute bi-alélico foi conseguido em linhas de células imortais utilizando outros processos tais como ZFN e clonagem por diluição (Liu et al., 2010). Outro grupo demonstrou recentemente KO bi-alélico de GGTA1 porcino utilizando reagentes ZFN comerciais (Hauschild et al., 2011) onde células nulas bi-alélicas poderiam ser enriquecidas por FACS para a ausência de um epítipo de superfície dependente de GGTA1. Embora esses estudos demonstrem certos conceitos úteis, eles não mostram que animais ou gado poderiam ser modificados porque a diluição clonal simples não é geralmente viável para isolados de fibroblasto primário (fibroblastos crescem mal em baixa densidade) e enriquecimento biológico para células nulas não está disponível para a maioria dos genes.

[067] A recombinação homóloga induzida por nuclease alvo pode ser utilizada para eliminar a necessidade de marcadores de seleção vinculados. A TALENs pode ser utilizada para precisamente transferir alelos específicos em um genoma de gado por reparo dirigido por homologia (HDR). Em um estudo piloto, foi introduzida uma deleção específica de 11 pb (o alelo Blue Belga) (Grobet et al., 1997, Kambadur et al., 1997) no locus bovino GDF81 (ver US 2012/0222143). Quando transfectado isoladamente, o par de TALEN btGDF8.1 clivou até 16% de cromossomos no locus alvo. Cotransfecção com um modelo de reparo de DNA homólogo super-enrolado que abrigava a deleção de 11 pb resultou em uma frequência de conversão gênica (HDR) de até 5% no dia 3 sem seleção para o evento desejado. A conversão gênica foi identificada em 1,4% das colônias isoladas que foram rastreadas. Estes resultados

demonstraram que a TALENs pode ser utilizada para induzir eficazmente HDR sem a ajuda de um marcador de seleção ligado.

Reparo dirigido por homologia (HDR)

[068] O reparo dirigido por homologia (HDR) é um mecanismo nas células para reparar lesões de ssDNA e DNA de cadeia dupla (dsDNA). Este mecanismo de reparo pode ser utilizado pela célula quando existe um modelo de HDR presente que tem uma sequência com homologia significativa ao local da lesão. A ligação específica, tal como este termo é vulgarmente utilizado nas técnicas biológicas, refere-se a uma molécula que se liga a um alvo com uma afinidade relativamente elevada em comparação com tecidos não alvo, e envolve geralmente uma pluralidade de interações não covalentes, tais como interações eletrostáticas, interações de van der Waals, ligação de hidrogênio, e similares. A hibridação específica é uma forma de ligação específica entre ácidos nucleicos que possuem sequências complementares. As proteínas também podem ligar-se especificamente ao DNA, por exemplo, em sistemas TALENs ou CRISPR/Cas9 ou por motivos Gal4. A introgressão de um alelo refere-se a um processo de copiar um alelo exógeno sobre um alelo endógeno com um processo guiado por modelo. O alelo endógeno pode realmente ser excisado e substituído por um alelo de ácido nucleico exógeno em algumas situações, mas a teoria atual é que o processo é um mecanismo de cópia. Uma vez que os alelos são pares de genes, há homologia significativa entre eles. O alelo pode ser um gene que codifica uma proteína, ou pode ter outras funções, tais como codificação de uma cadeia de RNA bioativo ou proporcionar um local para receber uma proteína reguladora ou RNA.

[069] O modelo HDR é um ácido nucleico que compreende o alelo que está sendo introgressado. O modelo pode ser um dsDNA ou um DNA de cadeia simples (ssDNA). Modelos de ssDNA são, de preferência entre cerca de 20 e cerca de 5000 resíduos, embora possam ser utilizados outros comprimentos. Os artesãos irão imediatamente perceber que todas as faixas e valores dentro da faixa explicitamente estabelecida estão contemplados; por exemplo, de 500 a 1500 resíduos, de 20 a 100 resíduos, e assim por diante. O modelo pode ainda compreender sequências flanqueadoras que proporcionam homologia com o DNA adjacente ao alelo endógeno ou ao DNA que se pretende substituir. O modelo pode também compreender uma sequência que está ligada a um sistema de nuclease alvo, e é assim o local de ligação cognato para o membro de ligação ao DNA do sistema. O termo cognato refere-se a duas biomoléculas que tipicamente interagem, por exemplo, um receptor e seu ligante. No contexto de processos HDR, uma das biomoléculas pode ser concebida com uma sequência para se ligar a um pretendido, isto é, cognato, local de DNA ou sítio de proteína.

Sistemas de endonuclease alvo

[070] As ferramentas de edição do genoma tal como as nucleases efetoras do tipo de ativador de transcrição (TALENs) e nucleases de dedo de zinco (ZFNs), têm influenciado os campos da biotecnologia, terapia genética e estudos genômicos funcionais em muitos organismos. Mais recentemente, as endonucleases guiadas por RNA (RGEN) são direcionadas para os seus sítios alvo por uma molécula de RNA complementar. O sistema Cas9/CRISPR é um RGEN. TracrRNA é outra ferramenta. Estes são exemplos de sistemas de

nucleases alvo: estes sistemas têm um membro de ligação ao DNA que localiza a nuclease a um sítio alvo. O sítio é então cortado pela nuclease. TALENs e ZFNs têm a nuclease fundida com o membro de ligação ao DNA. Cas9/CRISPR são cognatos que encontram uns aos outros no DNA alvo. O membro de ligação ao DNA tem uma sequência cognata ao DNA cromossômico. O membro de ligação ao DNA é tipicamente concebido à luz da sequência cognata pretendida de modo a obter uma ação nucleolítica em, ou perto, de um local pretendido. Certas formas de realização são aplicáveis a todos esses sistemas sem limitação; incluindo, formas de realização que minimizam reclinagem de nuclease, formas de realização para produzir SNPs com precisão em um resíduo pretendido, e colocação do alelo que está sendo introgressado no local de ligação ao DNA.

TALENs

[071] O termo TALEN, tal como aqui utilizado, é amplo e inclui uma TALEN monomérica que pode clivar DNA de cadeia dupla sem a ajuda de outra TALEN. O termo TALEN também é usado para se referir a um ou ambos os membros de um par de TALENs que são projetados para trabalhar em conjunto para clivar DNA no mesmo local. TALENs que trabalham em conjunto podem ser referidos como uma TALEN esquerda e TALEN direita, que refere a destreza de DNA ou um TALEN-par.

[072] A criptografia para TALs foi relatada (Publicação PCT WO 20111072246) em que cada repetição de ligação ao DNA é responsável por reconhecer um par de bases na sequência de DNA alvo. Os resíduos podem ser montados para direcionar uma sequência de DNA. Em resumo, um sítio alvo para a ligação de uma TALEN é determinado e uma molécula de fusão compreendendo uma nuclease e uma série de RVDs que

reconhecem o local alvo é criado. Após a ligação, a nuclease cliva o DNA de modo que o mecanismo de reparo celular pode operar para fazer uma modificação genética nas extremidades cortadas. O termo TALEN significa uma proteína compreendendo um domínio de ligação do efetor do tipo ativador de transcrição (TAL) e um domínio de nuclease e inclui TALENs monoméricas que são funcionais *per se* assim como outras que requerem dimerização com outra TALEN monomérica. A dimerização pode resultar em uma TALEN homodimérica quando ambos as TALEN monoméricas são idênticas ou pode resultar numa TALEN heterodimérica quando as TALEN monoméricas são diferentes. Foi demonstrado que a TALENs induzem a modificação genética em células humanas imortalizadas por meio das duas vias principais de reparo do DNA eucariótico, união de extremidade não homóloga (NHEJ) e reparo dirigido por homologia. As TALENs são frequentemente utilizadas em pares, mas as TALENs monoméricas são conhecidas. As células para tratamento por TALENs (e outras ferramentas genéticas) incluem uma célula cultivada, uma célula imortalizada, uma célula primária, uma célula somática primária, um zigoto, uma célula germinativa, uma célula germinativa primordial, um blastocisto ou uma célula estaminal. Em algumas formas de realização, um efetor de TAL pode ser utilizado para direcionar outros domínios de proteína (por exemplo, domínios de proteínas não nuclease) para sequências de nucleotídeos específicos. Por exemplo, um efetor de TAL pode ser ligado a um domínio de proteína a partir, sem limitação, de uma enzima que interage com o DNA 20 (por exemplo, uma metilase, uma topoisomerase, uma integrase, uma transposase, ou uma ligase), um ativador ou repressor de transcrição, ou

uma proteína que interage com ou modifique outras proteínas tais como histonas. As aplicações de tais fusões efetoras de TAL incluem, por exemplo, a criação ou modificação de elementos reguladores epigenéticos, fazendo inserções, deleções ou reparações específicas do local no DNA, controlando a expressão do gene e modificando a estrutura da cromatina.

[073] O termo nuclease inclui exonucleases e endonucleases. O termo endonuclease refere-se a qualquer enzima do tipo selvagem ou variante capaz de catalisar a hidrólise (clivagem) de ligações entre ácidos nucleicos dentro de uma molécula de DNA ou RNA, de preferência uma molécula de DNA. Exemplos não limitativos de endonucleases incluem endonucleases de restrição do tipo II tais como *FokI*, *HhaI*, *HindIII*, *NotI*, *BbvCI*, *EcoRI*, *BglII* e *AlwI*. As endonucleases compreendem também endonucleases de corte raro quando tendo tipicamente um local de reconhecimento polinucleotídico de cerca de 12 a 45 pares de base (pb) de comprimento, mais preferencialmente de 14 a 45 pb. As endonucleases de corte raro induzem quebras de dupla cadeia de DNA (DSBs) em um locus definido. As endonucleases de corte raro podem ser, por exemplo, uma endonuclease direcionada, uma nuclease quimérica de Dedo-Zinco (ZFN) resultante da fusão de domínios de dedo de zinco manipulados com o domínio catalítico de uma enzima de restrição tal como *FokI* ou uma endonuclease química. Em endonucleases químicas, um cortador químico ou peptídico é conjugado quer a um polímero de ácidos nucleicos quer a outro DNA que reconhece uma sequência alvo específica, direcionando assim a atividade de clivagem para uma sequência específica. As endonucleases químicas também

abrangem nucleases sintéticas como conjugados de ortofenantrolina, uma molécula de clivagem de DNA e oligonucleotídeos formadores de triplex (TFOs), conhecidos por ligarem a sequências de DNA. Tais endonucleases químicas estão compreendidas no termo "endonuclease" de acordo com a presente invenção. Exemplos de tal endonuclease incluem *1-See I*, *1-Chu L 1-Cre I*, *1-Csm I*, *PI-See L PI-Tti L PI-Mtu I*, *I-Ceu I*, *I-See IL 1-See III*, *HO*, *PI-Civ I*, *PI-Ctr L PI-Aae I*, *Pl-Bsu I*, *Pl-Dha I*, *Pl-Dra L PI-Mav L PI-Meh I*, *PI-Mfu L PI-Mfl I*, *PI-Mga L PI-Mgo I*, *PI-Min L PI-Mka L PI-Mle I*, *Pl-MmaI*, *PI-30 Msh L PI-Msm I*, *PI-Mth I*, *PI-Myu I*, *PI-Mxe I*, *PI-Npu I*, *Pl-Pfu L PI-Rma I*, *PI-Spb I*, *PI-Ssp L PI-Fae L PI-Mja I*, *PI-Pho L PI-Tag L PI-Thy I*, *PI-Tko I*, *PI-Tsp I*, *1-Msol*.

[074] Uma modificação genética feita por TALENs ou outras ferramentas pode ser, por exemplo, escolhida da lista que consiste em uma inserção, uma deleção, inserção de um fragmento de ácido nucleico exógeno, e uma substituição. O termo inserção é utilizado amplamente para significar quer a inserção literal no cromossomo ou a utilização da sequência exógena como um modelo para reparo. Em geral, um local de DNA alvo é identificado e um par de TALEN é criado que irá ligar-se especificamente ao local. A TALEN é liberada à célula ou embrião, por exemplo, como uma proteína, mRNA ou por um vetor que codifica a TALEN. A TALEN cliva o DNA para fazer uma quebra de cadeia dupla que é então reparada, muitas vezes resultando na criação de um indel, ou incorporando sequências ou polimorfismos contidos em um ácido nucleico exógeno que acompanha o que é ou inserido no cromossomo ou serve como um modelo para reparo da ruptura com uma sequência

modificada. Este reparo baseado em modelos é um processo útil para mudar um cromossomo, e prevê mudanças efetivas nos cromossomos celulares.

[075] O termo ácido nucleico exógeno significa um ácido nucleico que é adicionado à célula ou ao embrião, independentemente de o ácido nucleico ser o mesmo ou distinto das sequências de ácido nucleico naturalmente na célula. O termo fragmento de ácido nucleico é amplo e inclui um cromossomo, um cassete de expressão, um gene, DNA, RNA, mRNA ou uma porção do mesmo. A célula ou embrião pode ser, por exemplo, escolhido do grupo que consiste de vertebrados não humanos, primatas humanos, bovinos, cavalos, suínos, ovelhas, galinhas, aves, coelhos, cabras, cães, gatos, animais de laboratório e peixes.

[076] Algumas formas de realização envolvem uma composição ou um método de produção de um gado geneticamente modificado e/ou artiodáctilo compreendendo a introdução de um par de TALEN no gado e/ou uma célula de artiodáctilo ou embrião que faz uma modificação genética ao DNA da célula ou embrião em um local que é especificamente ligado pela TALEN-par, e produzindo o animal de gado/ artiodáctilo da célula. A injeção direta pode ser utilizada para a célula ou embrião, por exemplo, em um zigoto, blastocisto ou embrião. Alternativamente, a TALEN e/ou outros fatores podem ser introduzidos em uma célula utilizando qualquer uma das muitas técnicas conhecidas para introdução de proteínas, RNA, mRNA, DNA ou vetores. Os animais geneticamente modificados podem ser produzidos a partir de embriões ou células de acordo com processos conhecidos, por exemplo, implantação do embrião em um hospedeiro gestacional, ou vários métodos de clonagem. A

frase "uma modificação genética ao DNA da célula em um local que é especificamente ligado pela TALEN", ou o semelhante, significa que a modificação genética é feita no sítio cortado pela nucleasse na TALEN quando a TALEN é especificamente ligada ao local alvo. A nucleasse não corta exatamente onde o par de TALEN se liga, mas sim a um local definido entre os dois locais de ligação.

[077] Algumas formas de realização envolvem uma composição ou um tratamento de uma célula que é utilizada para clonar o animal. A célula pode ser uma célula pecuária e/ou artiodáctila, uma célula cultivada, uma célula primária, uma célula somática primária, um zigoto, uma célula germinal, uma célula germinal primordial ou uma célula estaminal. Por exemplo, uma forma de realização é uma composição ou um método de criação de uma modificação genética compreendendo a exposição de uma pluralidade de células primárias em uma cultura a proteínas de TALEN ou a um ácido nucleico que codifica uma TALEN ou TALENs. As TALENs podem ser introduzidas como proteínas ou como fragmentos de ácido nucleico, por exemplo, codificadas por mRNA ou uma sequência de DNA em um vetor.

Nucleases de dedo de zinco

[078] As nucleases de dedo de zinco (ZFNs) são enzimas de restrição artificiais geradas pela fusão de um domínio de ligação ao DNA de dedo de zinco a um domínio de clivagem de DNA. Os domínios de dedo de zinco podem ser geneticamente modificados para direcionar sequências de DNA desejadas e isto permite que as nucleases de dedo de zinco direcionar sequências únicas dentro de genomas complexos. Aproveitando-se do reparo endógeno do DNA, estes reagentes podem ser

usados para alterar os genomas dos organismos mais altos. As ZFNs podem ser utilizadas no processo de inativação de genes.

[079] Um domínio de ligação ao DNA de dedo de zinco tem cerca de 30 aminoácidos e dobra para uma estrutura estável. Cada dedo liga-se principalmente a um triplete dentro do substrato de DNA. Os resíduos de aminoácidos em posições-chave contribuem para a maioria das interações específicas da sequência com o local do DNA. Estes aminoácidos podem ser alterados mantendo os restantes aminoácidos para preservar a estrutura necessária. A ligação a sequências de DNA mais longas é conseguida ligando vários domínios em tandem. Outras funcionalidades como o domínio (N) de clivagem de FokI não específico, domínios ativadores de transcrição (A), domínios repressores de transcrição (R) e metilases (M) podem ser fundidos a ZFPs para formar ZFNs respectivamente, ativadores de transcrição de dedo de zinco (ZFA), repressores de transcrição de dedo de zinco (ZFR) e metilases de dedo de zinco (ZFM). Materiais e métodos para utilizar dedos de zinco e nucleases de dedo de zinco para a produção de animais geneticamente modificados são revelados, por exemplo, US 8.106.255, US 2012/0192298, US 2011/0023159 e US 2011/0281306.

Vetores e ácidos nucleicos

[080] Uma variedade de ácidos nucleicos pode ser introduzida em células, para fins de nocaute, para inativação de um gene, para obter expressão de um gene, ou para outros fins. Tal como aqui utilizado, o termo ácido nucleico inclui DNA, RNA e análogos de ácido nucleico e ácidos nucleicos que são de cadeia dupla ou de cadeia simples (isto é, uma cadeia simples de sentido ou antessentido). Os análogos de ácidos

nucleicos podem ser modificados na porção de base, porção de açúcar ou espinha dorsal de fosfato para melhorar, por exemplo, estabilidade, hibridação ou solubilidade do ácido nucleico. A espinha dorsal de fosfato de desoxirribose pode ser modificada para produzir ácidos nucleicos morfolino, em que cada porção de base está ligada a um anel morfolino de seis membros, ou ácidos nucleicos peptídicos, em que a espinha dorsal de desoxifosfato é substituída por uma espinha dorsal de pseudo-peptídeo e as quatro bases são mantidas.

[081] A sequência de ácido nucleico alvo pode ser operacionalmente ligada a uma região reguladora tal como um promotor. As regiões reguladoras podem ser regiões reguladoras porcinas ou podem ser de outras espécies. Tal como aqui utilizado, operativamente ligado refere-se ao posicionamento de uma região reguladora em relação a uma sequência de ácido nucleico de uma maneira tal que permita ou facilite a transcrição do ácido nucleico alvo.

[082] Em geral, o tipo de promotor pode ser operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico alvo. Exemplos de promotores incluem, sem limitação, promotores específicos de tecidos, promotores constitutivos, promotores indutíveis e promotores que respondem ou não respondem a um estímulo particular. Em algumas formas de realização, um promotor que facilita a expressão de uma molécula de ácido nucleico sem uma especificidade tecidual ou temporal significativa pode ser utilizado (isto é, um promotor constitutivo). Por exemplo, pode ser utilizado um promotor de beta-actina tal como o promotor do gene da beta-actina de galinha, promotor de ubiquitina, promotor de miniCAGs, promotor de gliceridaído-3-fosfato desidrogenase

(GAPDH) ou promotor de quinase de 3-fosfoglicerato (PGK), bem como promotores virais tais como o promotor da timidina-quinase do vírus herpes simplex (HSV-TK), o promotor SV40, ou um promotor citomegalovírus (CMV). Em algumas formas de realização, é utilizada como promotor uma fusão do promotor do gene da beta-actina do galinha e o intensificador do CMV. Ver, por exemplo, Xu et al., Hum. Gene Ther. 12:563, 2001; e Kiwaki et al., Hum. Gene Ther. 7:821, 1996.

[083] Regiões reguladoras adicionais que podem ser úteis em construtos de ácido nucleico incluem, mas não estão limitadas a, sequências de poliadenilação, sequências de controle de tradução (por exemplo, um segmento de entrada de ribossoma interno, IRES), intensificadores, elementos indutíveis ou introns. Tais regiões reguladoras podem não ser necessárias, embora possam aumentar a expressão através de uma transcrição, estabilidade do mRNA, eficiência de tradução, ou semelhantes. Tais regiões reguladoras podem ser incluídas em um construto de ácido nucleico como desejado para obter a expressão ótima dos ácidos nucleicos na(s) célula(s). A expressão suficiente, no entanto, pode, por vezes, ser obtida sem esses elementos adicionais.

[084] Pode ser utilizado um construto de ácido nucleico que codifique peptídeos de sinal ou marcadores expressos selecionáveis. Podem ser utilizados peptídeos de sinal de modo que um polipeptídeo codificado é dirigido para uma localização celular particular (por exemplo, a superfície celular). Exemplos não limitativos de marcadores selecionáveis incluem puromicina, ganciclovir, adenosina desaminase (ADA), aminoglicosídeo fosfotransferase (neo, G418, APH), di-hidrofolato redutase (DHFR), higromicina-B-

fosfotransferase, timidina quinase (TK) e xantina-guanina fosforibosiltransferase (XGPRT). Tais marcadores são úteis para a seleção de transformantes estáveis em cultura. Outros marcadores selecionáveis incluem polipeptídeos fluorescentes, tais como proteína fluorescente verde ou proteína fluorescente amarela.

[085] Em algumas formas de realização, uma sequência que codifica um marcador selecionável pode ser flanqueada por sequências de reconhecimento para uma recombinase tal como, por exemplo, Cre ou Flp. Por exemplo, o marcador selecionável pode ser flanqueado por sítios de reconhecimento *loxP* (sítios de reconhecimento de 34-bp reconhecidos pela Cre recombinase) ou locais de reconhecimento FRT de tal modo que o marcador selecionável pode ser excisado a partir da construto. Ver, Orban et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89:6861, 1992, para uma revisão da tecnologia Cre/lox, e Brand and Dymecki, Dev. Cell, 6:7, 2004. Um transpóson contendo um transgene ativável por Cr ou Flp interrompido por um gene marcador selecionável também pode ser utilizado para obter animais transgênicos com expressão condicional de um transgene. Por exemplo, um promotor que dirige a expressão do marcador/transgene pode ser ou ubíqua ou específica do tecido, o que resultaria na expressão ubíqua ou específica do tecido do marcador em animais F0 (por exemplo, porcos). A ativação específica do tecido do transgene pode ser conseguida, por exemplo, cruzando um porco que expressa de forma ubíqua um transgene interrompido por marcador para um porco expressando Cre ou Flp de um modo específico do tecido, ou cruzando um porco que expressa um transgene interrompido por marcador em um

modo específico de tecido a um porco que expressa de forma ubíqua Cre ou Flp recombinase. A expressão controlada do transgene ou excisão controlada do marcador permite a expressão do transgene.

[086] Em algumas formas de realização, o ácido nucleico exógeno codifica um polipeptídeo. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo pode incluir uma sequência de marcação que codifica uma "marcação" concebida para facilitar a subsequente manipulação do polipeptídeo codificado (por exemplo, para facilitar a localização ou detecção). As sequências de marcação podem ser inseridas na sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de tal modo que a marcação codificada está localizada no terminal carboxila ou amino do polipeptídeo. Exemplos não limitativos de marcações codificadas incluem glutathione S-transferase (GST) e marcação FLAG[™] (Kodak, New Haven, CT).

[087] Construtos de ácido nucleico podem ser introduzidos em células artiodáctila/gado embrionárias, fetais ou adultas de qualquer tipo, incluindo, por exemplo, células germinais tais como um oócito ou um ovo, uma célula progenitora, uma célula estaminial adulta ou embrionária, uma célula de germe primordial, uma célula de rim tal como uma célula PK-15, uma célula de ilhéu, uma célula beta, uma célula de fígado ou um fibroblasto tal como um fibroblasto dérmico, utilizando uma variedade de técnicas. Exemplos não limitativos de técnicas incluem a utilização de sistemas de transpóson, viroses recombinantes que podem infectar células, ou lipossomas ou outros métodos não virais tais como eletroporação, microinjeção, ou precipitação de fosfato

de cálcio, que são capazes de fornecer ácidos nucleicos às células.

[088] Em sistemas de transpóson, a unidade de transcrição de um construto de ácido nucleico, isto é, a região reguladora operacionalmente ligada a uma sequência de ácido nucleico exógena, é flanqueada por uma repetição invertida de um transpóson. Vários sistemas de transpóson, incluindo, por exemplo, Sleeping Beauty (ver, US 6.613.752 e US 2005/0003542); Frog Prince (Miskey et al., Nucleic Acids Res., 31:6873, 2003); Tol2 (Kawakami, Genome Biology, 8 (Supl. 1): S7, 2007); Minos (Pavlopoulos et al., Genome Biology, 8 (Suppl.1):S2, 2007); Hsmar1 (Miskey et al., Mol Cell Biol., 27:4589, 2007); e Passport foram desenvolvidos para introduzir ácidos nucleicos em células, incluindo camundongos, humanos e células de porco. O transpóson da Sleeping Beauty é particularmente útil. Uma transposase pode ser administrada como uma proteína, codificada no mesmo construto de ácido nucleico como o ácido nucleico exógeno, pode ser introduzida em um construto de ácido nucleico separado, ou fornecida como um mRNA (por exemplo, um mRNA transcrito e capeado *in vitro*).

[089] Os ácidos nucleicos podem ser incorporados em vetores. Um vetor é um termo amplo que inclui qualquer segmento de DNA específico que seja concebido para se deslocar de um transportador para um DNA alvo. Um vetor pode ser referido como um vetor de expressão, ou um sistema de vetor, que é um conjunto de componentes necessários para provocar a inserção de DNA em um genoma ou outra sequência de DNA alvo tal como um segmento de DNA de episoma, de plasmídeo ou mesmo de vírus/fago. Sistemas de vetor tais

como vetores virais (por exemplo, retrovírus, vírus adeno-associados e vetores de fagos integrantes), e vetores não virais (por exemplo, transpósons) utilizados para liberação de genes em animais têm dois componentes básicos: 1) um vetor constituído por DNA (ou RNA que é reverso transcrito em um cDNA) e 2) uma transposase, recombinase ou outra enzima integrase que reconhece tanto o vetor como uma sequência alvo de DNA e insere o vetor na sequência de DNA alvo. Os vetores geralmente contêm uma ou mais cassetes de expressão que compreendem uma ou mais sequências de controle de expressão, em que uma sequência de controle de expressão é uma sequência de DNA que controla e regula a transcrição e/ou a tradução de outra sequência de DNA ou mRNA, respectivamente.

[090] São conhecidos muitos tipos diferentes de vetores. Por exemplo, os plasmídeos e vetores virais, por exemplo, vetores retrovirais, são conhecidos. Os plasmídeos de expressão de mamíferos têm tipicamente uma origem de replicação, um promotor adequado e potenciador opcional, e também quaisquer sítios de ligação ao ribossoma necessários, um sítio de poliadenilação, sítios doadores e aceitador de splice, sequências de terminação da transcrição e sequências não transcritas flanqueando 5'. Exemplos de vetores incluem: plasmídeos (que também podem ser um transportador de outro tipo de vetor), adenovírus, vírus adeno-associados (AAV), lentivírus (por exemplo, HIV-1 modificado, SIV ou FIV), retrovírus (por exemplo, ASV, ALV ou MoMLV) e transpósons (por exemplo, Sleeping Beauty, elementos P, Tol-2, Frog Prince, piggyBac).

[091] Tal como aqui utilizado, o termo ácido nucleico refere-se tanto ao RNA como ao DNA, incluindo, por exemplo, cDNA, DNA genômico, DNA sintético (por exemplo, sintetizado quimicamente), bem como ácidos nucleicos naturais e quimicamente modificados, por exemplo, bases sintéticas ou espinhas dorsal alternativas. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de cadeia dupla ou de cadeia simples (isto é, uma cadeia simples de sentido ou antissentido). O termo transgênico é aqui amplamente utilizado e refere-se a um organismo geneticamente modificado ou a um organismo geneticamente modificado cujo material genético foi alterado utilizando técnicas de engenharia genética. Um artiodáctilo nocaute é assim transgênico independentemente de se expressarem ou não genes exógenos ou ácidos nucleicos no animal ou sua progênie.

Animais geneticamente modificados

[092] Os animais podem ser modificados utilizando TALENs ou outras ferramentas genéticas, incluindo proteínas de fusão recombinase, ou vários vetores conhecidos. Uma modificação genética por tais ferramentas pode compreender o rompimento de um gene. O termo rompimento de um gene refere-se impedir a formação de um produto genético funcional. Um produto genético só é funcional se cumprir as suas funções normais (tipo selvagem). O rompimento do gene impede a expressão de um fator funcional codificado pelo gene e compreende uma inserção, deleção ou substituição de uma ou mais bases em uma sequência codificada pelo gene e/ou um promotor e/ou um operador que é necessário para a expressão do gene no animal. O gene rompido pode ser rompido, por exemplo, remoção de pelo menos uma porção do gene a

partir de um genoma do animal, alteração do gene para impedir a expressão de um fator funcional codificado pelo gene, um RNA interferente ou expressão de um gene dominante negativo por um gene exógeno. Materiais e métodos de modificação genética de animais estão detalhados nas US 8.518.701; US 2010/0251395; e US 2012/0222143 que são aqui incorporadas por referência para todos os fins; em caso de conflito, a presente divulgação está controlando. O termo trans-atuante refere-se a processos que atuam sobre um gene alvo a partir de uma molécula diferente (isto é, intermolecular). Um elemento trans-atuante é habitualmente uma sequência de DNA que contém um gene. Este gene codifica uma proteína (ou microRNA ou outra molécula difusível) que é utilizada na regulação do gene alvo. O gene trans-atuante pode estar no mesmo cromossomo que o gene alvo, mas a atividade é através da proteína intermediária ou RNA que codifica. As formas de realização do gene trans-atuante são, por exemplo, genes que codificam endonucleases alvo. A inativação de um gene usando um negativo dominante envolve geralmente um elemento trans-atuante. O termo cis-regulador ou cis-atuante significa uma ação sem codificação para proteína ou RNA; no contexto da inativação gênica, isto significa geralmente inativação da porção de codificação de um gene, ou um promotor e/ou operador que é necessário para a expressão do gene funcional.

[093] Várias técnicas conhecidas na técnica podem ser utilizadas para inativar genes para produzir animais nocaute e/ou para introduzir construtos de ácido nucleico em animais para produzir animais fundadores e para produzir linhas de animais, nos quais o nocaute e construto de ácido nucleico está integrado no genoma. Tais técnicas incluem, sem

limitação, microinjeção pronuclear (US 4.873.191), transferência de genes mediada por retrovírus em linhas de germe (Van der Putten et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 82:6148-6152, 1985), segmentação de gene em células tronco embrionárias (Thompson et al., Cell, 56:313-321, 1989), eletroporação de embriões (Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814, 1983), transferência de genes mediada por esperma (Lavitrano et al., Proc. Natl Acad. Sci USA, 99: 14230-14235, 2002, Lavitrano et al., Reprod. Fert. Develop., 18:19-23, 2006) e transformação *in vitro* de células somáticas, tais como células cúmulos ou mamárias, ou células tronco adultas, fetais ou embrionárias, seguidas de transplante nuclear (Wilmut et al., Nature, 385:810-813, 1997; Wakayama et al., Nature, 394: 369-374, 1998). Microinjeção pronuclear, transferência de gene mediada por esperma, e a transferência nuclear de células somáticas são técnicas particularmente úteis. Um animal que é modificado genomicamente é um animal em que todas as suas células têm a modificação genética, incluindo as suas células de linha de germe. Quando se utilizam métodos que produzem um animal que é mosaico na sua modificação genética, os animais podem ser endogâmicos e progênes genomicamente modificados podem ser selecionados. A clonagem, por exemplo, pode ser usada para fazer um animal de mosaico se suas células são modificadas no estado de blastocisto, ou modificação genômica pode ocorrer quando uma única célula é modificada. Os animais que são modificados que não amadurecerem sexualmente podem ser homozigóticos ou heterozigóticos para a modificação, dependendo da abordagem específica que é utilizada. Se um gene particular for inativado por uma modificação nocaute, a homozigose não seria

necessariamente necessária. Se um determinado gene é inativado por uma interferência de RNA ou estratégia negativa dominante, então a heterozigose é frequentemente adequada.

[094] Tipicamente, na microinjeção pronuclear, um construto de ácido nucleico é introduzido em um ovo fertilizado; 1 ou 2 ovos fertilizados de células são usados como os pronúcleos que contem o material genético da cabeça do esperma e o ovo é visível dentro do protoplasma. Os ovos fertilizados por etapas pronucleares podem ser obtidos *in vitro* ou *in vivo* (isto é, cirurgicamente recuperados a partir do oviduto dos animais doadores). Os ovos fertilizados *in vitro* podem ser produzidos como se segue. Por exemplo, os ovários de suínos podem ser coletados em um matadouro e mantidos a 22-28°C durante o transporte. Os ovários podem ser lavados e isolados para aspiração folicular e os folículos variando de 4-8 mm podem ser aspirados em tubos cônicos de centrífuga de 50 ml usando agulhas de calibre 18 e sob vácuo. O fluido folicular e oócitos aspirados podem ser enxaguados através de pré-filtros com TL-HEPES comercial (Minitube, Verona, WI). Os oócitos rodeados por uma massa de cumulus compacta podem ser selecionados e colocados no Meio de maturação de oócitos TCM-199 (Minitube, Verona, WI) suplementado com 0,1 mg/mL de cisteína, 10 ng/ml de fator de crescimento epidérmico, 10% de fluido folicular suíno, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 0,5 mg/ml de cAMP, 10 UI/ml de gonadotropina de soro de égua grávida (PMSG) e gonadotropina coriônica humana (hCG) durante aproximadamente 22 horas em ar umidificado a 38,7°C e CO₂ a 5%. Subsequentemente, os oócitos podem ser movidos para meio de maturação TCM-199 fresco, que não irá conter cAMP, PMSG ou hCG e incubado

durante mais 22 horas. Os ovócitos amadurecidos podem ser retirados das suas células cumulus por vortex em hialuronidase a 0,1% durante 1 minuto.

[095] Para suínos, os ovócitos maduros podem ser fertilizados em 500 µl Minitube do Sistema do meio IVF Porcpro (Minitube, Verona, WI) em placas de fertilização Minitube de 5 poços. No preparo para a fertilização *in vitro* (FIV), o sêmen de javali recém-coletado ou congelado pode ser lavado e ressuspenso em meio PORCPRO IVF até 4×10^5 espermatozoides. As concentrações de espermatozoides podem ser analisadas por análise de sêmen assistida por computador (SPERMVISION, Minitube, Verona, WI). A inseminação *in vitro* final pode ser realizada em um volume de 10 µl a uma concentração final de aproximadamente 40 espermatozoides/oócito motil, dependendo do javali. Incubar todos os oócitos de fertilização a 38,7°C em atmosfera de CO₂ a 5,0% durante 6 horas. Seis horas após a inseminação, os zigotos presumíveis podem ser lavados duas vezes em NCSU-23 e movidos para 0,5 ml do mesmo meio. Este sistema pode produzir 20-30% de blastocistos rotineiramente na maioria dos javalis com um polipeptídeo de 10 a 30% de taxa de inseminação.

[096] Os construtos de ácido nucleico linearizados podem ser injetados em um dos pronúcleos. Em seguida, os ovos injetados podem ser transferidos para uma fêmea receptora (por exemplo, para os ovidutos de uma fêmea receptora) e deixados desenvolver na fêmea receptora para produzir os animais transgênicos. Em particular, os embriões fertilizados *in vitro* podem ser centrifugados a 15.000 X g durante 5 minutos para de sedimento de lipídeos permitindo a visualização dos pronúcleos. Os embriões podem ser

injetados usando um Eppendorf injetor FEMTOJET e podem ser cultivados até a formação de blastocisto. As taxas de clivagem de embriões e de formação de blastocistos e qualidade podem ser registradas.

[097] Os embriões podem ser transferidos cirurgicamente para o útero de recipientes assíncronos. Tipicamente, 100-200 (por exemplo, 150-200) embriões podem ser depositados na junção ampolar-istmo do oviduto utilizando um cateter TOMCAT® de 5,5 polegadas. Após a cirurgia, o exame ultrassonográfico em tempo real da gravidez pode ser realizado.

[098] Na transferência nuclear de células somáticas, uma célula artiodáctila transgênica (por exemplo, uma célula de porco transgênica ou uma célula bovina) tal como um blastômero embrionário, fibroblasto fetal, fibroblasto de orelha adulta, ou célula granulosa que inclui um construto de ácido nucleico descrito acima, pode ser introduzida em um oócito enucleado para estabelecer uma célula combinada. Os oócitos podem ser enucleados por dissecação da zona parcial perto do corpo polar e depois pressionando o citoplasma na área de dissecação. Tipicamente, uma pipeta de injeção com uma ponta chanfrada afiada é usada para injetar a célula transgênica em um oócito enucleado preso na meiose 2. Em algumas convenções, os oócitos detidos na meiose 2 são denominados ovos. Após a produção de um embrião porcino ou bovino (por exemplo, por fusão e ativação do oócito), o embrião é transferido para os ovidutos de um receptor fêmea, cerca de 20 a 24 horas após a ativação. Ver, por exemplo, Cibelli et al., Science, 280:1256-1258, 1998; e US 6.548.741. Para os suínos, as fêmeas receptoras podem ser verificadas

para gravidez aproximadamente 20 a 21 dias após a transferência dos embriões.

[099] Podem ser utilizadas técnicas de reprodução padrão para criar animais que sejam homozigóticos para o ácido nucleico exógeno dos animais fundadores heterozigóticos iniciais. Entretanto, a homozigose pode não ser necessária. Os porcos transgênicos aqui descritos podem ser criados com outros porcos de interesse.

[100] Em algumas formas de realização, um ácido nucleico de interesse e um marcador selecionável podem ser proporcionados em transpósons separados e fornecidos quer a embriões quer a células em quantidade desigual, onde a quantidade de transpóson contendo o marcador selecionável excede largamente (o excesso de 5 a 10 vezes) o transpóson contendo o ácido nucleico de interesse. As células ou animais transgênicos que expressam o ácido nucleico de interesse podem ser isoladas com base na presença e expressão do marcador selecionável. Porque os transpósons irão integrar no genoma de uma maneira precisa e não ligada (eventos de transposição independentes), o ácido nucleico de interesse e o marcador selecionável não estão geneticamente ligados e podem ser facilmente separados por segregação genética através de reprodução padrão. Assim, podem ser produzidos animais transgênicos que não são obrigados a reter marcadores selecionáveis em gerações subsequentes, uma questão de alguma preocupação de uma perspectiva de segurança pública.

[101] Uma vez que o animal transgênico tenha sido gerado, a expressão de um ácido nucleico exógeno pode ser avaliada utilizando técnicas convencionais. A triagem inicial pode ser realizada por análise de transferência de

Southern para determinar se a integração do construto ocorreu ou não. Para uma descrição da análise de Southern, ver seções 9.37-9.52 de Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, segunda edição, Cold Spring Harbor Press, Plainview; NY, 1989. As técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) também podem ser utilizadas na triagem inicial. PCR se refere a um procedimento ou técnica em que os ácidos nucleicos alvo são amplificados. Geralmente, as informações de sequência das extremidades da região de interesse ou mais além são empregadas para conceber iniciadores de oligonucleotídeos que são idênticos ou semelhantes em sequência a cadeias opostas do modelo a ser amplificado. A PCR pode ser usada para amplificar sequências específicas do DNA bem como RNA, incluindo sequências a partir do DNA genômico total ou RNA celular total. Os iniciadores tipicamente têm de 14 a 40 nucleotídeos de comprimento, mas podem variar entre 10 nucleotídeos a centenas de nucleotídeos de comprimento. A PCR é descrita em, por exemplo, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, ed. Dieffenbaeh e Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Os ácidos nucleicos também podem ser amplificados por reação de cadeia de ligase, amplificação de deslocamento de cadeia, replicação de cadeia autossustentada, ou sequência de ácido nucleico baseado amplificado. Ver, por exemplo, Lewis, *Genetic Engineering News*, 12: 1, 1992; Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1874, 1990; e Weiss, *Science*, 254: 1292, 1991. No estágio do blastocisto, os embriões podem ser individualmente preparados para análise por PCR, hibridação de Southern e splinkerette PCR (ver, por exemplo, Dupuy et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4495, 2002).

[102] A expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo nos tecidos de suínos transgênicos pode ser avaliada utilizando técnicas que incluem, por exemplo, análise de Northern blot de amostras de tecido obtidas a partir do animal, análise de hibridização *in situ*, análise de Western, imunoensaaios tais como e ensaios imunoabsorventes com ligação de enzima, e transcriptase reversa da PCR (RT-PCR).

RNAs interferentes

[103] Uma variedade de RNA interferente (RNAi) é conhecida. O RNA de cadeia dupla (dsRNA) induz a sequência-degradação específica de transcrições de genes homólogos. Complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) metaboliza dsRNA para pequenos 21 a 23 nucleotídeo de RNAs de pequena interferência (siRNAs). O RISC contém uma RNase de cadeia dupla (dsRNase, por exemplo, Dicer) e ssRNase (por exemplo, Argonaut 2 ou Ago2). O RISC utiliza uma cadeia antissentido como um guia para encontrar um alvo clivável. Ambos siRNAs e microRNAs (miRNAs) são conhecidos. Um método de ruptura de um gene em um animal geneticamente modificado induz a interferência de RNA contra um gene alvo e/ou um ácido nucleico, de modo que a expressão do gene alvo e/ou do ácido nucleico é reduzida.

[104] Por exemplo, a sequência de ácido nucleico exógeno pode induzir interferência de RNA contra um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo. Por exemplo, o RNA de pequena interferência de cadeia dupla (siRNA) ou o RNA de pequeno grampo (hairpin) (shRNA) homólogo a um DNA alvo pode ser utilizado para reduzir a expressão desse DNA. Construtos para siRNA podem ser produzidos como descritos, por exemplo,

em Fire et al., Nature, 391: 806, 1998; Romano e Masino, Mol. Microbiol., 6: 3343, 1992; Cogoni et al., EMBO J., 15: 3153, 1996; Cogoni e Masino, Nature, 399:166, 1999; Misquitta e Paterson Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:1451, 1999; e Kennerdell e Carthew, Cell, 95:1017, 1998. Os construtos para shRNA podem ser produzidos como descrito por McIntyre e Fanning (2006) BMC Biotechnology 6:1. Em geral, os shRNAs são transcritos como uma molécula de RNA de cadeia simples que contém regiões complementares, que podem recobrar e formar grampos curtos.

[105] A probabilidade de encontrar um único, individual siRNA funcional ou miRNA dirigido a um gene específico é elevada. A previsibilidade de uma sequência específica de siRNA, por exemplo, é de cerca de 50%, mas um número de RNAs interferentes pode ser feito com boa confiança de que pelo menos um deles será eficaz.

[106] As formas de realização incluem uma célula *in vitro*, uma célula *in vivo* e um animal geneticamente modificado tal como um animal de gado que expressam um RNAi dirigido contra um gene, por exemplo, um gene seletivo para uma fase de desenvolvimento. O RNAi pode ser, por exemplo, selecionado do grupo que consiste de siRNA, shRNA, dsRNA, RISC e miRNA.

Sistemas induzíveis

[107] Um sistema induzível pode ser utilizado para controlar a expressão de um gene. São conhecidos vários sistemas induzíveis que permitem o controle espaciotemporal da expressão de um gene. Vários foram provados ser funcionais *in vivo* em animais transgênicos. O termo sistema induzível

inclui promotores tradicionais e elementos de expressão de genes induzíveis.

[108] Um exemplo de um sistema induzível é o sistema de promotor de tetraciclina (tet)-on, que pode ser utilizado para regular a transcrição do ácido nucleico. Neste sistema, um repressor Tet mutado (TetR) é fundido ao domínio de ativação da proteína trans-ativadora VP16 do vírus herpes simplex para criar um ativador transcricional controlado por tetraciclina (tTA), o qual é regulado por tet ou doxíciclina (dox). Na ausência de antibiótico, a transcrição é mínima, enquanto na presença de tet ou dox, a transcrição é induzida. Os sistemas induzíveis alternativos incluem os sistemas ecdisona ou rapamicina. Ecdisona é um hormônio de muda de inseto cuja produção é controlada por um heterodímero do receptor de ecdisona e o produto do gene *ultraspiracle* (USP). A expressão é induzida por tratamento com ecdisona ou um análogo de ecdisona tal como muristerona A. O agente que é administrado ao animal para ativar o sistema induzível é referido como um agente de indução.

[109] O sistema induzível por tetraciclina e o sistema recombinase Cre/loxP (quer constitutivo quer induzível) estão entre os sistemas induzíveis mais vulgarmente utilizados. O sistema induzível por tetraciclina envolve um transativador controlado por tetraciclina (tTA)/tTA reverso (rtTA). Um método para utilizar estes sistemas in vivo envolve a geração de duas linhas de animais geneticamente modificados. Uma linha de animal expressa o ativador (tTA, rtTA ou Cre recombinase) sob o controle de um promotor selecionado. Outro conjunto de animais transgênicos expressa o aceitador, no qual a expressão do gene de interesse (ou o

gene a ser modificado) está sob o controle da sequência alvo para os transativadores tTA/rtTA (ou é flanqueada por sequências loxP). O acasalamento das duas cepas de ratinhos proporciona o controle da expressão gênica.

[110] Os sistemas reguladores dependentes de tetraciclina (sistemas tet) dependem de dois componentes, isto é, um transativador controlado por tetraciclina (tTA ou rtTA) e um promotor dependente de tTA/rtTA que controla a expressão de um cDNA a jusante, de um modo dependente de tetraciclina. Na ausência de tetraciclina ou dos seus derivados (tal como doxiciclina), tTA liga-se a sequências de tetO, permitindo a ativação transcricional do promotor dependente de tTA. Contudo, na presença de doxiciclina, o tTA não pode interagir com o seu alvo e a transcrição não ocorre. O sistema tet que usa tTA é denominado tet-OFF, porque a tetraciclina ou a doxiciclina permite a regulação transcricional. A administração de tetraciclina ou dos seus derivados permite o controle temporal da expressão do transgene in vivo. rtTA é uma variante da tTA que não é funcional na ausência de doxiciclina mas requer a presença do ligante para transativação. Este sistema tet é, portanto, designado por tet-ON. Os sistemas tet foram utilizados in vivo para a expressão induzível de diversos transgenes, codificação, por exemplo, genes repórter, oncogenes ou proteínas envolvidas em uma cascata de sinalização.

[111] O sistema Cre/lox utiliza a Cre recombinase, que catalisa a recombinação específica local por cruzamento entre duas sequências de reconhecimento de Cre distantes, isto é, sítios loxP. Uma sequência de DNA introduzida entre as duas sequências loxP (denominado DNA floxed) é excisada

por recombinação mediada por Cre. O controle da expressão de Cre em um animal transgênico, utilizando ou controle espacial (com um promotor específico de tecido ou célula) ou controle temporal (com um sistema induzível), resulta no controle da excisão de DNA entre os dois locais loxP. Uma aplicação é para inativação gênica condicional (nocaute condicional). Outra abordagem é para a proteína sobre-expressão, em que um códon de paragem floxed é inserido entre a sequência promotora e o DNA de interesse. Os animais geneticamente modificados não expressam o transgene até Cre é expresso, levando à excisão do códon de paragem floxed. Este sistema foi aplicado à oncogênese específica de tecido e à expressão controlada do receptor antigênico em linfócitos B. Cre recombinases induzíveis também foram desenvolvidos. A Cre recombinase induzível é ativada apenas pela administração de um ligante exógeno. As Cre recombinases induzíveis são proteínas de fusão contendo a Cre recombinase original e um domínio de ligação ao ligante específico. A atividade funcional da Cre recombinase é dependente de um ligante externo que é capaz de se ligar a este domínio específico na proteína de fusão.

[112] As formas de realização incluem uma célula in vitro, uma célula in vivo e um animal geneticamente modificado tal como um animal de gado que compreende um gene sob controle de um sistema induzível. A modificação genética de um animal pode ser genômica ou mosaica. O sistema induzível pode ser, por exemplo, selecionado do grupo que consiste de Tet-On, Tet-Off, Cre-lox e Hiflalfa. Uma forma de realização é um gene aqui estabelecido.

Negativos dominantes

[113] Os genes podem assim ser rompidos não somente pela remoção ou supressão de RNAi mas também pela criação/expressão de uma variante negativa dominante de uma proteína que tem efeitos inibitórios sobre a função normal desse produto gênico. A expressão de um gene dominante negativo (DN) pode resultar em um fenótipo alterado, exercido por a) um efeito de titulação; O DN PASSIVELY concorre com um produto genético endógeno para ou um fator cooperativo ou o alvo normal do gene endógeno sem elaborar a mesma atividade, b) um efeito de pílula venenosa (ou chave de macaco) em que o produto gênico dominante negativo ACTIVELY interfere com um processo requerido para a função genética normal, c) um efeito de realimentação, em que o DN ACTIVELY estimula um regulador negativo da função do gene.

Animais fundadores, linhagens, traços e reprodução de animais

[114] Os animais fundadores (geração F0) podem ser produzidos por clonagem e outros métodos aqui descritos. Os fundadores podem ser homozigóticos para uma modificação genética, como no caso onde um zigoto ou uma célula primária sofre uma modificação homozigótica. Similarmente, os fundadores também podem ser feitos que são heterozigotos. Os fundadores podem ser genomicamente modificados, o que significa que as células em seu genoma sofreram modificação. Os fundadores podem ser mosaicos para uma modificação, como pode acontecer quando vetores são introduzidos em uma de uma pluralidade de células em um embrião, tipicamente em um estágio de blastocisto. A progênie de animais do mosaico pode ser testada para identificar progênies que são genomicamente modificadas. Uma linhagem de animal é

estabelecida quando um pool de animais foi criado que pode ser reproduzido sexualmente ou por técnicas de reprodução assistida, com progênie heterogênea ou homozigótica consistentemente expressando a modificação.

[115] No gado, muitos alelos são conhecidos por estarem ligados a vários traços tais como traços de produção, traços de tipo, traços de trabalhabilidade e outros traços funcionais. Os artesãos estão acostumados a monitorar e quantificar estes traços, por exemplo, Visscher et al., *Livestock Production Science*, 40: 123-137, 1994; US 7.709.206; US 2001/0016315; US 2011/0023140; e US 2005/0153317. Uma linhagem de animal pode incluir um traço escolhido de um traço no grupo que consiste de um traço de produção, um traço de tipo, um traço de trabalhabilidade, um traço de fertilidade, um traço de maternidade e um traço de resistência à doença. Outros traços incluem a expressão de um produto gênico recombinante.

Recombinases

[116] As formas de realização da invenção incluem a administração de um sistema de nuclease alvo com uma recombinase (por exemplo, uma proteína RecA, uma Rad51) ou outra proteína de ligação ao DNA associada à recombinação de DNA. Uma recombinase forma um filamento com um fragmento de ácido nucleico e, de fato, procura DNA celular para encontrar uma sequência de DNA substancialmente homóloga à sequência. Por exemplo, uma recombinase pode ser combinada com uma sequência de ácido nucleico que serve como um modelo para HDR. A recombinase é então combinada com o modelo de HDR para formar o filamento e colocada na célula. A recombinase e/ou modelo de HDR que combina com a recombinase pode ser

colocada na célula ou embrião como uma proteína, um mRNA, ou com um vetor que codifica a recombinase. A divulgação do documento US 2011/0059160 (Pedido de Patente US No. 12/869.232) é aqui incorporada por referência para todos os fins; em caso de conflito, a divulgação está controlando. O termo recombinase refere-se a uma enzima de recombinação genética que enzimaticamente catalisa, em uma célula, a junção de pedaços relativamente curtos de DNA entre duas cadeias de DNA relativamente mais longas. Recombinases incluem Cre recombinase, Hin recombinase, RecA, RAD51, Cre e FLP. A Cre recombinase é uma topoisomerase de Tipo I a partir de bacteriófago P1 que catalisa a recombinação específica do sítio de DNA entre sítios loxP. Hin recombinase é uma proteína 21kD composta de 198 aminoácidos que é encontrada na bactéria *Salmonella*. Hin pertence à família serina recombinase de DNA invertases na qual se baseia na serina do sítio ativo para iniciar a clivagem e recombinação do DNA. RAD51 é um gene humano. A proteína codificada por este gene é um membro da família de proteínas RAD51 que auxilia na reparo de rupturas de dupla cadeia de DNA. Membros da família RAD51 são homólogos ao RecA bacteriano e ao Rad51 de levedura. Cre recombinase é uma enzima que é utilizada em experimentos para eliminar sequências específicas que são flanqueadas por sítios loxP. FLP refere-se à enzima de recombinação de Flippase (FLP ou Flp) derivada do plasmídeo 2 μ da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*.

[117] Aqui, "RecA" ou "proteína RecA" refere-se a uma família de proteínas de recombinação como RecA tendo essencialmente a totalidade ou a maior parte das mesmas funções, em particular: (i) a capacidade de posicionar

adequadamente oligonucleotídeos ou polinucleotídeos nas seus alvos homólogos para subsequente extensão por DNA polimerases; (ii) a capacidade topologicamente de preparar ácido nucleico duplex para a síntese de DNA; e, (iii) a capacidade de complexos de RecA/oligonucleotídeo ou RecA/polinucleotídeo de se enquadrarem eficientemente e se ligarem a sequências complementares. A proteína RecA melhor caracterizada é de *E. coli*; em adição da forma alélica original da proteína, um número de proteínas semelhantes a RecA mutante, por exemplo, RecA803. Além disso, muitos organismos têm proteínas de transferência de cadeia semelhantes a RecA incluindo, por exemplo, leveduras, *Drosophila*, mamíferos incluindo seres humanos e plantas. Estas proteínas incluem, por exemplo, Rec1, Rec2, Rad51, Rad51B, Rad51C, Rad51D, Rad51E, XRCC2 e DMCI. Uma forma de re4alização da proteína de recombinação é a proteína RecA de *E. coli*. Alternativamente, a proteína RecA pode ser a proteína mutante RecA-803 de *E. coli*, uma proteína RecA de outra fonte bacteriana ou uma proteína de recombinação homóloga de outro organismo.

Composições e kits

[118] A presente invenção também proporciona composições e kits contendo, por exemplo, moléculas de ácido nucleico que codificam endonucleases sítio-específicas, CRISPR, Cas9, ZNFs, TALENs, fusões RecA-gal4, polipeptídeos das mesmas, composições contendo tais moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeos ou linhagens de células geneticamente modificadas. Um HDR também pode ser fornecido que é eficaz para a introgressão de um alelo indicado. Tais

itens podem ser utilizados, por exemplo, como ferramentas de pesquisa, ou terapeuticamente.

EXEMPLOS

[119] Métodos são os seguintes, a menos que indicado de outro modo.

Cultura de tecidos e transfecção.

[120] Porcos foram mantidos a 37°C a 5% de CO₂ em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U. I./ml de penicilina e estreptomicina e 2 mM de L-Glutamina. Para a transfecção, todos as TALENs e modelos de HDR foram administrados através de transfecção utilizando do Sistema de transfecção NEON (Life Technologies). Resumidamente, a passagem baixa Ossabaw, Landrace atingindo 100% de confluência foram divididas 1:2 e colhidas no dia seguinte a 70-80% de confluência. Cada transfecção foi compreendida de 500.000-600.000 células ressuspensas em tampão "R" misturado com TALEN mRNA e oligos e eletroporadas utilizando as pontas de 100µl que proporcionam um volume de trabalho de 100 µl por meio dos seguintes parâmetros: tensão de entrada; 1800V; Largura do pulso; 20ms; e Número de Pulso; I. Tipicamente, 1-2 µg de TALEN mRNA e 1-4 µM de modelos de HDR (oligonucleotídeos de cadeia simples) específicos para o gene de interesse foram incluídos em cada transfecção. O desvio dessas quantidades é indicado nas figuras e legendas. Após transfecção, as células foram plaqueadas em um poço de uma placa de 6 poços durante três dias e cultivadas a 30°C. Depois de três dias, as populações de células foram plaqueadas para análise de colônias e/ou expandidas e a 37°C até pelo menos dia 10 para avaliar a estabilidade das edições.

Deteccão de mutação Surveyor e análise de RFLP.

[121] A PCR flanqueando os sítios pretendidos foi realizada utilizando PLATINUM Taq DNA polimerase HiFi (Life Technologies) com 1 µl do lisado celular de acordo com as recomendações do fabricante. A frequência de mutação em uma população foi analisada com o Kit de deteção de mutação SURVEYOR (Transgenomic) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando 10 µl do produto de PCR como descrito acima. A análise RFLP foi realizada em 10 µl da reação de PCR acima utilizando a enzima de restrição indicada. As reações de Surveyor e RFLP foram resolvidas em géis de poliacrilamida TBE a 10% e visualizadas por coloração com brometo de etídio. As medidas de densitometria das bandas foram realizadas utilizando IMAGEJ; e a taxa de mutação das reações Surveyor foi calculada como descrito em Guschin et al., 2010(1). A percentagem de reparo dirigida de homologia (HDR) foi calculada dividindo a intensidade da soma dos fragmentos de RFLP pela intensidade de soma dos fragmentos de banda parental + fragmentos de RFLP. A análise por RFLP de colônias foi tratada de forma semelhante exceto que os produtos de PCR foram amplificados por IX MYTAQ RED MIX (Bioline) e resolvida em géis de agarose a 2,5%.

Clonagem por diluição.

[122] Três dias após a transfecção, 50 a 250 células foram semeadas em placas de 10 cm e cultivadas até as colônias individuais atingirem cerca de 5 mm de diâmetro. Neste momento, foram adicionados 6 ml de TRYPLE (Life Technologies) 1:5 (vol/vol) diluído em PBS e as colônias foram aspiradas, transferidas para poços de uma placa de 24 cavidades e cultivadas nas mesmas condições. As colônias que

atingiram a confluência foram coletadas e divididas para criopreservação e genotipagem.

Preparação da amostra.

[123] As populações de células transfectadas ao dia 3 e 10 foram coletadas de uma placa de 6 poços e 10 a 30% foram ressuspensas em 50 µl de tampão de lise compatível com PCR IX: Tris Cl 10 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, 0,45% de TRYTON X-100 (vol/vol), 0,45% de TWEEN-20 (vol/vol) recentemente suplementado com 200 µg/ml de Proteinasa K. Os lisados foram processados em um termociclador utilizando o seguinte programa: 55°C durante 60 minutos, 95°C durante 15 minutos. As amostras de colônias da clonagem por diluição foram tratadas como acima utilizando 20-30 µl de tampão da lise.

Tabela D: Listagem de sequências de ligação a endonuclease e modelos HDR.			
Gene	Exemplo	Endonuclease	Modelo HDR
<i>Exemplo</i>		L: código diresíduo de repetição variável (RVD) para monômero TALEN esquerdo R: código RVD para monômero TALEN direito OU Cas9/CRJSPR, sgRNA: sequência gRNA, 5' a 3'	Sequência de oligo ssDNA, 5' a 3'
<i>IL2Ry</i>	1, 3	L: HD HD HD NI NI NI NN NNNG NG HD NI NN NG NN NG NG NG (SEQ ID N0:4) R: HD HD NI NI NN NG NN HD NI NI NG NG HD NI NG NN NG N1 HD NG (SEQ ID N0:5)	TTCCACTCTACCCCCCAAAGG TTCAGTGTGTTGTGTAAGCTTCAA TGTTGAGTACATGAATTGCACTT GGGACAGCAGCTCTGAGCTC (SEQ ID N0:27)
<i>RAG2</i>	1, 3	L: NI HD HD NG NG HD HD NG HD HD NG HD NG HD NN HD NG (SEQ ID N0:6) R: HD NG NI NI NN HD NG NN HD NG NG NG NG NN NI NI NG (SEQ ID N0:7)	CTCTAAGGATTCTGCCACCTTCC TCCTCTCCGCTACCCAGACTAAG CTTTGCACATTCAAAGCAGCTT AGGGTCTGAAAACATCAGT (SEQ ID N0:28)
<i>APC</i>	2, 3	L: NN NN NI NI NN NI NI NN NG NI NG HD NI NN HD HD NI NG (SEQ ID N0:8) R: NN NI HD HD HD N1 NN NI NI NG NG NG HD NG NN NG (SEQ ID N0:9)	CCAGATCGCCAAAGTCACGGAAG AAGTATCAGCCATTATCCCTCC CAGTGAAGCTTACAGAAATCTG GGTCGACCACGGAGTTGCACT (SEQ ID N0:29)

P53	2, 3	L: NN NN HD NI HD HD HD NNNGNNNGHDHDDN HD NN HD (SEQ ID NO: 10) R: HD NI NG NN NG NI HD NG HD NG NN NI HD NG NG (SEQ ID NO:11)	AGCTCGCCACCCCGCCGGGCAC CCGTGTCCGCGCCATGGCCATCT AAGCTTAAAGAAAGTCAGAGTACA TGCCCGAGGTGGTGAGGCGCT (SEQ ID NO:30)
KISSR	3	L: NN HD NG HD NG NI HD NG HD NG NI HD HD HD HD (SEQ ID NO: 12) R: NN HD NI HD NI NG NN NI NI NN NG HD NN HD HD HD NI (SEQ ID NO:13)	GTGCTGCGTGCCCTTTACTGCTCT ACTCTACCCCTACCAGCCTAAG CTTGTGCTGGGCGACTTCATGTG CAAGTTCCTCAACTACATCC (SEQ ID NO:31)
EIF4GI	3, 7	L: HD HD NN NG HD HD NG NG NG NN HD HD NI NI HD HD NG NG (SEQ ID NO:14) R: NG NN NN NN NN NN HD HD HD NI HD NN NN NG NG NN HD NG (SEQ ID NO:15)	CCCAGACTTCACTCCGTCCTTGC CGACTTCGGCCGACCAGCCCTTA GCAACCGTGGGCCCCCAAGGGGT GGGCCAGGTGGGGAGCTGCC (SEQ ID NO:32)
LDLR	3	L: HD NG HD HD NG NI HD NI NI NN NG NN NN NI NG NG NG (SEQ ID NO:16) R: HD NN NN NI HD HD HD NNNGHDHNGNGNNHD NI HD NG (SEQ ID NO: 17)	CCGAGACGGGAAATGCACCTCCT ACAAGTGGATTGTGATGGATCC GAACACCGAGTGCAAGGACGGG TCCGCTGAGTCCCTGGAGACGT (SEQ ID NO:33)
DMD	3	L: NN NN NI HD NG NN NI HD HDNI HDNGNINGNG (SEQ ID NO:18) R: NI NN NI NN NI NI NG NN NG NNNNG HD HD NI NN HD (SEQ ID NO:19)	AAAGTGGCCTGGCCCAACCCCTG GACTGACCACTCGAGTATTGAAG CACGTAAGTATGCTGGACCACAT TCTCTATGGCTGTAGACATTC (SEQ ID NO:34)
NKX2-5	6	L: HD NN HD NI NN NN HD NI HD NI NNNNNG HD NG NI HD (SEQ ID NO:20) R: NI HD HD NN HD NGNN HD NG NN HD NG NG NN NI (SEQ ID NO:21)	CTCTTTTCGAGGCACAGGTCTA CGAGCTGGAGCGACGCTTCTAAG CTTGCAGCAGCGGTACCTGTCCG CTCCCGAGCGTGACCAGTTGG (SEQ ID NO:35)
MESPI	6	L: NN HD NN NN NG NG NN HDNGHDHDDHDDHDDN HD HD (SEQ ID NO:22) R: NN NN HD HD NN NN NN NN HD NN HD NG NN HD NI HD HD (SEQ ID NO:23)	TGCGGTGCTCCCCGCTCGTCC CCGTAAGCTTGACTCCTGGTGCA GCGCCCCGGCCAG (SEQ ID NO:36)
GATA4	6	L: NI NG NN NG NG NG NN NI NG NN NI HD NG NG HD (SEQ ID NO:24) R: NN NN HD HD HD HD NN HD NI NN NG NG NN NI HD NI HD (SEQ ID NO:25)	AACCCTGTGTGTTTCCACCCA GTAGATATGTTGATGACTAAGC TTCTCGGAAGGCAGAGAGTGTGT CAACTGCGGGGCCATGTCCAC (SEQ ID NO:37)
P65	7	Cas9/CRISPR, sgRNA: CGTCACCAACGGTCTCCTC TCGG (SEQ ID NO:26)	GCTCCCACTCCCTGGGGGCCTC TGGGCTCACCAACGGTCTCCTCC CGGGGACGAAGACTTCTCCTCC ATTGCGGACATGGACTTCTCA (SEQ ID NO:38)

Exemplo 1 Edição de gene multiplex

[124] Seis condições de TALEN mRNA e modelos de HDR direcionados para *RAG2* e *IL2Rr* de porco foram co-transfectadas em fibroblastos de porco. Uma quantidade fixa de mRNA de *RAG2* e modelo foram utilizados para cada transfecção enquanto que a quantidade de mRNA de *IL2Rg* TALEN e modelo HDR é alterada para cada condição como indicado. A dosagem de TALEN mRNA e modelo de HDR tem efeitos tanto no e fora do alvo. Um aumento no TALEN mRNA para *IL2Rγ* levou a um aumento tanto no NHEJ como no HDR para *IL2Rγ* enquanto que os níveis de NHEJ para *RAG2* permaneceram inalterados. Um aumento no modelo de HDR de *IL2Rγ* reduziu o HDR no locus *RAG2* sugerindo uma inibição não específica de homologia dirigida para reparo por escalada da concentração de oligonucleotídeo. Colônias com HDR bi-alélico em *RAG2* e *IL2Rγ* foram obtidos a quatro e dois por cento de duas condições (Fig. 3 painel c, painel d) que está em e acima da frequência esperada da esperada de dois por cento. A frequência esperada é calculada pela multiplicação dos níveis HDR do dia 3 que trata cada alelo HDR como um evento independente. Com referência à Figura 3, edição de genes multiplex de suínos *RAG2* e *IL2Rγ*. a) A análise SURVEYOR e RFLP para determinar a eficiência da junção final não homóloga (NHEJ) e o reparo dependente por homologia HDR nas populações de células de 3 dias após a transfecção. b) Análise de RFLP para reparo dirigido por homologia em populações de células 11 dias após transfecção. c) Percentagem de colônias positivas para HDR em *IL2Rγ*, *RAG2* ou em ambos. As células foram plaqueadas a partir da população indicada por um "C" no painel a. A distribuição de genótipos de colônias é mostrado abaixo. d) Análise de colônias a partir de células transfectadas com

quantidades de TALEN mRNA de 2 e 1 µg para *IL2Rγ* e *RAG2* e modelo de HDR a 1 µM para cada uma. A distribuição de genótipos de colônias é mostrada abaixo.

Exemplo 2 Edição de gene multiplex

[125] Quatro condições de TALEN mRNA e modelos de HDR direcionados a APC e p53 de porco foram co-transfectadas em fibroblastos de porco. A quantidade de mRNA de APC foi sequencialmente reduzida da esquerda para a direita (Figura 4, painel b); o restante das quantidades permaneceu constante como indicado. Percentagem de HDR reduzida em uma mansão linear com redução do mRNA da APC. Houve pouco efeito em HDR de p53 com dosagem alterada de TALENs APC. A genotipagem de colônias revelou uma união maior do que o esperado de clones com alelo HDR tanto em APC como em p53 em relação aos valores do dia 11; 18 e 20 por cento versus 13,7 e 7,1 por cento para a Figura 4 painel c e Figura 4 painel d, respectivamente. Com referência à Figura 4 edição de genes multiplex de suínos APC e p53. Painel a) análise Surveyor e RFLP para determinar a eficiência da junção de extremidade não homóloga (NHEJ) e reparo dirigido por homologia HDR em populações celulares 3 dias após a transfecção. Painel b) análise de RFLP para reparo dirigido por homologia em populações de células 11 dias após transfecção. Painéis c) e d) percentagem de colônias positivas derivadas da população de células indicadas (indicadas no painel a, "C" e "D") para HDR em APC, p53 ou ambos. As colônias com 3 ou mais alelos de HDR estão listados abaixo.

Exemplo 3 Multiplex com pelo menos três genes

[126] No Exemplo 1, foi observada uma redução não específica em HDR na alta concentração de oligo de HDR, assim

era desconhecido se os oligos 2+ de HDR podiam ser eficazes sem inibição não específica de HDR. Duas concentrações foram testadas, 1 uM e 2 uM para cada local alvo. Embora a atividade de TALEN não tenha sido significativamente alterada entre as duas condições, o HDR foi reduzido significativamente a uma concentração de 2 uM para cada modelo. Os clones derivados da condição 1 uM apresentavam uma variedade de genótipos, alguns deles com edições em cada gene e até 7 alelos (Figura 6). Se tratados como eventos independentes, a frequência esperada do genótipo denotado por um "a", com 7 alelos editados, é 0,001 por cento. A distribuição binomial prediz a probabilidade de identificar colônias 2+ de tal um genótipo em um tamanho de amostra de 72, como foi feito aqui, é menor do que 0,000026 por cento. Esta alta taxa de sucesso não poderia ser prevista e é inesperada e surpreendente. Este resultado foi replicado com duas combinações de adição de modelo TALENs/HDR (Figuras 7 e 8). Tal como com os resultados do primeiro ensaio, as colônias foram obtidos com edições de HDR em até sete alelos e até quatro genes (Tabela A). Diversos genótipos foram recuperados a uma frequência muito maior do que o esperado por acaso. Embora uma preocupação com relação a quebra simultânea de dupla cadeia em diversos loci seja a indução de rearranjos cromossômicos não intencionais, 50 dos 50 cariótipos testados a partir do ensaio 3 células foram normais (dados não mostrados).

[127] Com referência à Figura 5: Efeito da concentração do modelo de HDR de oligonucleotídeo na eficiência de HDR multiplex em 5-genes. As quantidades indicadas de TALEN mRNA direcionadas a *RAG2*, *IL2Rg*, *p53*, *APC* e *LDLR* de suíno foram co-transfectadas em fibroblastos de

porco juntamente com 2 uM (painel a) ou 1 uM (painel b) de cada modelo de HDR cognato. A percentagem de NHEJ e HDR foram medidas por ensaio Surveyor e RFLP. Com referência à Figura 6: Genótipos de colônias a partir de HDR multiplex de 5 genes. Os genótipos de colônias foram avaliados por análise de RFLP. Painel a) Cada linha representa o genótipo de uma colônia em cada locus especificado. Três genótipos poderiam ser identificados; aqueles com o genótipo de RFLP esperado de HDR heterocigótico ou homozigótico, bem como aqueles com um fragmento positivo de RFLP, mais um segundo alelo que tem um deslocamento visível no tamanho indicativo de um alelo de inserção ou de deleção (indel). A percentagem de colônias com uma edição no locus especificado é indicada abaixo de cada coluna. Painel b) Um registro do número de colônias editado a 0 a 5 loci. Com referência à Figura 7: Genótipos de colônia de um segundo ensaio multiplex de 5 genes. Painel a) Cada linha representa o genótipo de uma colônia em cada locus especificado. Três genótipos poderiam ser identificados; aqueles com o genótipo RFLP esperado de HDR heterozigótico ou homozigótico bem como aqueles com um fragmento positivo de RFLP, mais um segundo alelo que tem uma mudança visível em tamanho indicativo de um alelo de inserção ou deleção (indel). A percentagem de colônias com uma edição no locus especificado é indicada abaixo de cada coluna. Painel b) Um registro do número de colônias editado a 0 a 5 loci.

Exemplos 4A-4DD

Exemplo 4A: Desenvolver fibroblastos de porco RAG2/IL2Rg nulos (RG-KO) por edição de genes multiplex.

[128] Os fibroblastos fetais do porco macho serão transfectados com TALENs e modelos de oligonucleotídeos para interrupção de *RAG2* e *IL2Rg* utilizando os métodos previamente definidos pelos inventores (Tan, W., et al. A introgressão de alelo não meiótica eficiente em animais utilizando endonucleases customizadas. *PNAS*, 110 (41): 16526-16531, 2013). Os candidatos a RG-KO serão identificados, por exemplo, pelo polimorfismo de comprimento de restrição (p. Ex., Polimorfismo de comprimento de restrição RFLP) como confirmado por sequenciação. Pelo menos cerca de 5 colônias de RG-KO validadas serão agrupadas como um recurso para clonagem e produção de quimeras.

Exemplo 4B: Produção de embriões quiméricos utilizando blastocistos hospedeiros RG-KO.

[129] Os embriões RG-KO hospedeiro e as células doadoras EGFP-fêmeas marcadas serão produzidos utilizando tecnologia de transferência de cromatina seguida por cultura in vitro para o estágio de blastocisto. As células RG-KO do Exemplo 1 podem ser utilizadas. Os aglomerados de células inter-dia 7 de blastocistos EGFP serão injetados em embriões RG-KO do dia 6 antes da transferência de embriões para uma porca sincronizados. Usando esta abordagem, Nagashima e colaboradores observaram quimerismo em > 50 por cento de leitões vivos nascidos (Nagashima, H., et al., A diferenciação do sexo e a produção de células germinativas em suínos quiméricos produzidos por injeção de massa celular interna em blastocistos. *Biol Reprod*, 70(3):702-707, 2004). O fenótipo masculino é dominante em quimeras de injeção tanto para ratinhos como para suínos. Portanto, hospedeiros XY RG-KO injetados com células doadoras femininas transmitirão

exclusivamente a genética do hospedeiro masculino. As verificações da gravidez serão conduzidas em momentos apropriados, por exemplo, nos dias 25, 50 e 100. As porcas grávidas a cerca de 100 dias de gestação serão monitoradas 4 vezes ao dia antes da derivação da secção C de leitões por volta do dia 114.

Exemplo 4C: Determinar se descendentes não quiméricos são deficientes para células T, B e NK.

[130] Os descendentes não quiméricos serão testados para determinar se são deficientes para as células T, B e NK. O seguinte processo é uma técnica para o mesmo. A derivação da seção C será conduzida em cada porca transportando quimeras presumíveis e uma porca produzida com leitões do tipo selvagem. Sangue do cordão umbilical será isolado de cada leitão imediatamente após a derivação da seção-C. Os leucócitos de sangue do cordão umbilical serão avaliados por triagem de células ativadas por fluorescência (FACS) para populações de células T, B e NK bem como a expressão EGFP derivada do doador. Além disso, o quimerismo será avaliado por PCR a partir de sangue do cordão umbilical, biópsia da orelha e da cauda. Esta análise inicial será concluída dentro de 6 horas do nascimento, de modo que os leitões não quiméricos possam ser monitorados de perto e humanamente eutanizados com sinais de infecção. Uma porção de animais não quiméricos, ou aqueles sem células imunológicas, serão sacrificados por necropsia.

Exemplo 4D: Identifica suínos quiméricos e determina a origem de células T, B e NK.

[131] Os porcos quiméricos serão testados para determinar a origem das células T, B e NK. O seguinte

processo é uma técnica para o mesmo. Os leitões quiméricos serão identificados utilizando os métodos acima. A avaliação semanal de linfócitos circulantes e imunoglobulina sérica será comparada entre leitões quiméricos, não quiméricos e de tipo selvagem durante um período de 2 meses. As populações de células T, B e NK classificadas serão avaliadas para expressão de EGFP e análise de microssatélite para confirmar a origem do doador. A manutenção de amostras e coletas de sêmen de porcos quiméricos será apoiada pelo RCI até que o financiamento da Fase 11 esteja disponível.

Procedimentos da amostra para Exemplos A-D:

Cordão umbilical e sangue periférico FACS.

[132] A avaliação dos linfócitos sanguíneos e o quimerismo EGFP serão realizados como descrito anteriormente (2) com adaptações para espécimes suínas. O sangue do cordão umbilical será coletado de cada leitão imediatamente após a derivação na seção-C. Uma porção do sangue do cordão umbilical será processada e criopreservada para possíveis tratamentos de aloenxerto, enquanto que o restante será utilizado para análise FACS de linfócitos. As amostras de sangue periférico serão coletadas nas 2, 4, 6 e 8 semanas de idade por métodos padrão. RBCs serão removidos e aproximadamente $1-2 \times 10^5$ células serão distribuídas em tubos. As alíquotas serão marcadas com anticorpos anti-porco para a identificação de células T (CD4 e CD8), células B (CD45RA ad CD3), células NK (CD16 e CD3) e células mieloides (CD3). A expressão de antígeno será quantificada no citômetro de fluxo LS RII (BD Biosciences). Os fluoróforos serão cuidadosamente selecionados para permitir a avaliação multiplex das células EGFP derivadas do doador juntamente

com antígenos de superfície. As suspensões de células únicas do baço serão analisadas por os mesmos métodos.

Exames.

[133] Todos os principais órgãos e tecidos serão cuidadosamente examinados quanto ao desenvolvimento anatômico apropriado e amostras apropriadas de todos os principais órgãos e tecidos, incluindo pâncreas, fígado, coração, rins, pulmões, gastrointestinal, sistema imunológico (periférico e gânglios linfáticos da mucosa e baço), e CNS será coletado para o isolamento do DNA. As suspensões de células individuais serão preparadas a partir do baço para análise FACS. Os tecidos serão preparados para exame histológico para avaliar ainda mais o quimerismo e quaisquer alterações que possam estar associadas ao estado quimérico e à presença de qualquer doença subjacente.

Avaliação do quimerismo.

[134] A PCR quantitativa será conduzida em biópsia de sangue do cordão umbilical, orelha e cauda utilizando iniciadores específicos para o transgene de EGFP e comparada com uma curva padrão com relações conhecidas de EGFP para células de tipo selvagem. Os espécimes serão também avaliados para os alelos RG-KO através do ensaio RFLP anteriormente descrito. Enxerto de células de EGFP+ será avaliado macroscopicamente em animais e órgãos inteiros durante a necropsia. Os tecidos dos principais órgãos serão seccionados para imuno-histoquímica de EGFP e contrastados com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) para determinar a proporção de doador para células hospedeiras.

Análise por microssatélites.

[135] Os animais serão rastreados por microssatélites informativos para genética de hospedeiros e doadores daqueles rotineiramente usados em nosso laboratório. Serão avaliadas amostras de tecidos e sangue (linfócitos classificados ou linhagens mieloides, EGFP positivo e negativo). Quantidades relativas de doador versus células hospedeiras serão avaliadas por sequenciação de amplicões multiplexados no instrumento MISEQ (Illumina).

Animais.

[136] Serão produzidos porcos não quiméricos com ausência de células T, B e NK no cordão e sangue periférico. Os porcos quiméricos terão níveis substancialmente semelhantes aos de tipo quase selvagem. Além disso, as quimeras positivas para células T, B e NK terão funções imunitárias substancialmente normais e permanecerão saudáveis quando criadas em condições padrão.

Exemplo 5 Concepção e produção de CRISPRJ/Cas9.

[137] As sequências de gRNA específicas de gene foram clonadas no vetor de gRNA de Church lab (Addgene ID: 41824) de acordo com os seus métodos. A nuclease Cas9 foi proporcionada por co-transfecção do plasmídeo hCas9 (Addgene ID: 41815) ou mRNA sintetizado a partir de RCIScript-hCas9. Este RCIScript-hCas9 foi construído subclonando o fragmento XbaI-AgeI do plasmídeo hCas9 (englobando o cDNA hCas9) no plasmídeo RCIScript. A síntese de mRNA foi conduzida como acima exceto que a linearização foi realizada utilizando KpnI.

[138] Exemplo 6 Edição de genes multiplex com endonucleases alvo e HDR. O painel (a) é um esquema de cada gene no experimento multiplex (representado como exões de

cDNA indicados por tons alternados) e o site alvo de TALENS é indicado. A sequência que codifica o domínio de ligação ao DNA para cada gene é indicada abaixo. Os fibroblastos de suíno foram co-transfectados com 1 ug de cada mRNA de TALEN e 0,1 nMol de cada oligo de HDR (Figura 12, painel b), tendo como alvo cada gene, concebido para inserir um códon de terminação prematuro bem como um novo local de RFLP de HindIII para genotipagem. Um total de 384 colônias foram isoladas para genotipagem. Foram realizados ensaios de O GATA4 e Nkx2-5 RFLP (Figura 12 painel c) e MESP1 foi avaliado por sequenciação (não mostrado). Duas colônias (2/384, 0,52%) foram nocautes de HDR homozigóticos para os três genes. Os nocautes triplos são marcados com asteriscos (Figura 12 painel c). Os genótipos adicionais podem ser observados no painel c, exemplo de colônia 49 sem edições de HDR; colônia 52 e 63 com edições heterozigóticas para NKX2-5; colônia 59 com edições heterozigóticas tanto para NKX2-5 e GATA4 e assim por diante.

Exemplo 7 Edição de gene multiplex utilizando uma combinação de TALENs e RGENs. Ver Figura 13. Os fibroblastos de suíno foram co-transfectados com os componentes TALENS (1 ug de EIF4G 14.1 mRNA) + Cas9/CRISPR (2 ug de mRNA de Cas9 + 2 ug de p65 Gls orientam RNA) e 02 nMol de oligo de HDR para cada gene. As células transfectadas foram avaliadas por ensaio RFLP revelando HDR em ambos os locais. As células desta população serão plaqueadas para isolamento de colônias e isolados com edições em ambos os genes são identificados.

DIVULGAÇÃO ADICIONAL

[139] Patentes, pedidos de patentes, publicações e artigos aqui mencionados são aqui incorporados por

referência; no caso de conflito, a presente revelação é controladora. As formas de realização têm várias características; estas características podem ser misturadas e combinadas conforme orientado pela necessidade de se fazer uma forma de realização funcional. As posições e subposições são proporcionadas para conveniência mas não são substanciais e não limitam o escopo do que é descrito. As seguintes indicações numeradas apresentam formas de realização da invenção:

1A. Um método de fazer edições genéticas em uma célula de vertebrado ou embrião em uma pluralidade de sítios de DNA cromossômico alvo compreendendo

introdução em uma célula de vertebrado ou embrião:

uma primeira endonuclease alvo direcionada para um primeiro sítio de DNA cromossômico alvo e um primeiro modelo de reparo dirigido por homologia (HDR) homóloga à primeira sequência de sítio alvo; e

uma segunda endonuclease alvo dirigida a um segundo local de DNA cromossômico alvo e um segundo modelo de HDR homólogo à segunda sequência de sítio alvo,

com a primeira sequência de modelo de HDR substituindo a sequência de DNA cromossômico nativa no primeiro local alvo e a segunda sequência de modelo de HDR substituindo a sequência de DNA cromossômico nativa na segunda sequência de sítio alvo.

1B. Um método de edição de uma pluralidade de alelos de um animal, compreendendo

introdução, em uma célula primária do gado ou um embrião de gado, uma pluralidade de nucleases alvo que cada

alvo um locus de alelo diferente e um modelo de reparo dirigido por homologia para cada locus de alelo alvo,

com as endonucleases alvo que fazem quebras de cadeia dupla nos loci de alelos cognatos para cada uma da pluralidade de endonucleases alvo e com a célula copiando a sequência de ácido nucleico de modelo de reparo de homologia (HDR) para os loci cognato a cada modelo de HDR para assim editar o alelo.

2. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, adicionalmente compreendendo

introdução na célula ou embrião de um ou mais de:

uma terceira, quarta, quinta, sexta e sétima endonuclease alvo dirigida a um terceiro, quarto, quinto, sexto, e sétimo sítios de DNA cromossômico alvo, respectivamente, e

um terceiro, quarto, quinto, sexto e sétimo modelos HDR homólogos aos terceiro, quarto, quinto, sexto e sétimo sítios de DNA cromossômico alvo, respectivamente.

3. Método de qualquer de 1 a 2 em que a endonuclease alvo compreende uma TALENs.

4. O método de qualquer um de 1 a 3 em que a endonuclease alvo compreende uma nucleasse de dedo de zinco ou um Cas9.

5. O método de qualquer um de 1 a 4 em que pelo menos o primeiro sítio de DNA cromossômico alvo é um locus para um alelo.

6. O método de 5 em que pelo menos um dos referidos modelos de HDR codificam um nocaute do sítio alvo de DNA cognato ao modelo.

7. O método de 5 em que pelo menos um dos referidos modelos de HDR codifica um alelo exógeno para substituição de um alelo no sítio alvo de DNA cognato ao modelo.

8. O método de 1 com a célula ou embrião sendo uma primeira espécie ou uma primeira raça de gado e uma pluralidade das edições compreende uma substituição de um alelo nativo com um alelo exógeno de uma segunda espécie ou uma segunda raça de animal.

9. O método de 1 com o animal sendo uma primeira raça de animal que tem pelo menos três alelos nativos substituídos por alelos exógenos correspondentes de uma segunda raça ou outra espécie, sendo os referidos alelos exógenos uma substituição do alelo nativo correspondente sem recombinação meiótica, em que o animal está isento de genes marcadores exógenos.

10. O método de 2 em que pelo menos três, quatro, seis, sete ou sete sítios de DNA de cromossomos alvo são cada um locus para um diferente alelo.

11. O método de 10 em que um ou mais dos modelos de HDR codifica um nocaute do sítio alvo de DNA cognato ao modelo.

12. O método de 10 em que pelo menos um dos referidos modelos de HDR codifica um alelo exógeno para substituição de um alelo no sítio alvo de DNA cognato ao modelo.

13. O método de qualquer um de 1 a 12, em que a célula ou embrião é homozigótico para uma pluralidade de edições de genes nos sítios de DNA alvo, sendo as referidas edições codificadas por modelos de HDR cognatos aos referidos sítios de DNA alvo.

14. O método de qualquer um de 1 a 12 em que a célula ou embrião é heterozigótico para uma pluralidade de edições de

genes nos locais de DNA alvo, sendo as referidas edições codificadas por modelos de HDR cognatos aos referidos sítios de DNA alvo.

15. O método de qualquer um de 11 a 14 em que as edições de genes compreendem um nocaute ou uma introgressão de um alelo de outra raça de animal ou outra espécie de animal.

16. O método de qualquer de 11 a 14 com a célula ou embrião sendo uma primeira espécie ou uma primeira raça de gado, e uma pluralidade das edições compreende uma substituição de um alelo nativo com um alelo exógeno de uma segunda espécie ou uma segunda raça de animal.

17. O método de 16, com sequências de DNA do alelo exógeno e do alelo nativo diferindo em uma ou mais posições, em que a substituição do alelo nativo com o alelo exógeno faz uma sequência de DNA cromossômica da célula ou embrião idêntica à segunda raça de animal ou segunda espécie para uma distância de pelo menos 200 pares de bases (bp) em cada lado de qualquer das referidas posições, conforme medido por um alinhamento através das referidas posições.

18. O método de 17 com a distância sendo um número entre 200 e 2000 bp.

19. O método de qualquer de 1 a 17 em que a célula ou embrião é homozigótico para uma pluralidade de edições de genes nos sítios de DNA alvo, sendo as referidas edições codificadas por modelos de HDR cognatos aos referidos sítios de DNA alvo.

20. O método de qualquer um de 1 a 17 em que a célula ou embrião é heterozigótica para uma pluralidade de edições de genes nos locais de DNA alvo, sendo as referidas edições

codificadas por modelos de HDR cognatos aos referidos sítios de DNA alvo.

21. O método de qualquer de 1 a 20 com a célula ou embrião sendo selecionado do grupo que consiste de vertebrado grande, gado, símio, cão, gato, aviário, pássaro, peixe, coelho, porco, bovino, búfalo, cabra, ovelha, e artiodáctilo.

22. O método de qualquer de 1 a 21 com a célula sendo selecionada do grupo que consiste de zigoto, células tronco, células tronco adultas, células pluripotentes, células progenitoras e células primárias.

23. O método de qualquer de 1 a 21 com o embrião sendo zigoto, blastocisto, mórula, ou tendo um número de células de 1 a 200.

24. O método de qualquer de 1 a 23 compreendendo a introdução de mRNAs que codificam uma ou mais das endonucleases e/ou um ou mais dos modelos de HDR.

25. O método de qualquer de 1 a 24 em que uma ou mais das endonucleases são introduzidas na célula ou embrião como uma proteína.

26. O método de qualquer de 1 a 25, em que
de uma ou mais (por exemplo, cada uma) das endonucleases são fornecidas como mRNAs e são introduzidos na célula ou embrião a partir de uma solução com uma concentração de 0,1 ng/ml a 100 ng/ml; os artesãos irão imediatamente apreciar que todos os valores e faixas dentro dos limites expressamente indicados estão contemplados, por exemplo, cerca de 20, desde cerca de 1 a cerca de 20, desde cerca de 0,5 a cerca de 50, e assim por diante; e/ou

de um ou mais (por exemplo, cada um) dos modelos de HDR são fornecidos como mRNAs e são introduzidos na célula ou embrião a partir de uma solução com uma concentração de cerca de 0,2 μ M a cerca de 20 μ M.

27. O método de qualquer de 1 a 26 compreendendo a eletroporação para a introdução de uma endonuclease e/ou modelo de HDR.

28. O método de qualquer de 1 a 27 em que a endonuclease e/ou HDR são introduzidos por um processo selecionado do grupo que consiste de métodos baseados em produtos químicos, métodos não químicos, métodos baseados em partículas e métodos virais.

29. O método de qualquer de 13 a 28 compreendendo a introdução de um ou mais vetores na célula ou embrião para expressar as endonucleases e/ou os modelos de HDR.

30. O método de qualquer de 1 a 29 em que as endonucleases alvo são TALENs, ou CRISPR, ou uma combinação de TALENs e CRISPR.

31. O método de 30 em que as edições são nocautes de genes.

32. O método de qualquer um de 1 a 31 em que uma ou mais das sequências de sítios alvo são escolhidas da seguinte lista, ou em que um ou mais dos alelos exógenos ou os alelos nativos são escolhidos da seguinte lista: IL2Rgy^{-/-}, RAG2^{-/-}, IL2RG^{-/-}, RAG2^{-/-}, IL2Rgy^{-/-}, RAG2^{-/-}, IL2Rg^{+/-}, RAG2^{+/-}, IL2Rg^{-/-}, RAG2^{+/-}, IL2Rg^{+/-}, RAG2^{+/-}, DGAT, (diglicerídeo aciltransferase), ABCG2 (cassete de ligação a subfamília G de membro 2), ACAN (aggrecan), AMELY (amelogenina, ligada a y), BLG (proteína endometrial associada a progestagênio), BMP 1B (FecB) (receptor de proteína morfogenética óssea,

tipo 1B), DAZL (suprimido em tipo azoospermia), Eif4GI (fator de iniciação de tradução eucariótica 4 gama 1), GDF8 (fator de crescimento/diferenciação 8), Hom-poll locus, IGF2 2 (fator de crescimento tipo insulina 2), CWC15 (proteína associada a spliceosome CWC15), KissR/GRP54 (kisspeptina), OFD1Y (pseudogene 1 da síndrome oral-facial-digital ligado a Y), p65 (v-relo reticuloendoteliose viral oncogene homólogo A), PRLR (receptor de prolactina), Prmd14 (domínio PR contendo 14), PRNP (proteína prião), Rosa, Socs2 (supressor da sinalização de citocinas 2), SRY (região determinante do sexo de Chr Y), ZFY (proteína de dedo de zinco, y-ligada), β -lactoglobulina, callypyge (CLPG), MODY 1 (HNF4 α) (fator nuclear de hepatócitos 4, alfa), MODY 2 (GCK) (glucoquinase), MODY 3 (HNF1 α) (fator nuclear de hepatócitos 4, alfa), MODY 4 (Pdx1) (homeobox 1 duodenal e pancreático), MODY 5 (HNF-1 β) (HNF1 homeobox B), MODY 6 (diferenciação eurogênica 1), MODY 7 (KLF11) (fator tipo Kruppel 11), MODY 8 (CEL) (lipase de ácido carboxílico), MODY 9 (PAX4) (Box pareado 4), MODY 10 (INS) (insulina), MODY 11 (BLK) (proto-oncogene BLK, tirosina quinase da família Src), MODY 8 (CEL) (carboxil éster lipase), MODY 9 (PAX4), APC (adenomatose polipóctica coli), ApoE (apolipoproteína E), DMD (distrofia muscular distrofina), GHRHR (receptor da hormônio de liberação do hormônio de crescimento), HR (crescimento de cabelo associado), HSD11B2 (hidroxiesteróide (11-beta) desidrogenase 2), LDLR (receptor de lipoproteína de baixa densidade), NF1 (neurofibromina 1), NPPA (peptídeo natriurético A), NR3C2 (subfamília de receptores nucleares 3, grupo C, membro 2) P53 (antígeno de tumor celular tipo p53), PKD1 (doença de rim policístico 1),

Rbm20 (proteína de motivo de ligação a RNA 20), SCN1G (canal de sódio, sem tensão subunidade gama 1), tp53 (proteína tumoral p53), FAH (fumarilacetoacetato hidrolase), HBB (hemoglobina beta), IL2RG (receptor de interleucina 2, cadeia gama), PDX1 (homeobox 1 pancreático e duodenal) PITX3 (fator 3 de transcrição de homeodomínio tipo pares), Runx1 (fator de transcrição 1 relacionado com runt), GGTA (cefalosporina acilase bifuncional/gama-glutamyltranspeptidase), VASA (proteína vasa) MIWI (silenciamento de genes mediado por RNA tipo piwi 1), PIWI (produto de gene CG6122 do transcrito CG6122-RA), DCAF17 (fator 17 associado a DDB1 e CUL4), VDR (receptor de vitamina D), PNPLA1 (domínio de fosfolipase tipo patatina contendo 1), HRAS (homólogo de oncogene viral de sarcoma de rato Harvey), Telomerase-vert, DSP (desmoplakin), SNRPE (polipeptídeo ribonucleoproteína nuclear pequeno E), RPL21 (proteína ribossomal), LAMA3 (laminina, alfa 3), UROD (uroporfirinogênio descarboxilase), EDAR (receptor ectodisplasina-A), OFD 1 (síndrome facial-digital-oral 1), PEX7 (fator 7 de biogênese peroxisomal), COL3A1 (colágeno, tipo III, alfa 1), ALOX12B (araquinodato 12-lipoxigenase tipo 12R), HCL1S (sintetase de holocarboxilase (biotina-(propionil-CoA-carboxilase)ATP-hidrólise))ligase)), NIPAL4 (domínio de tipo NIPA contendo 4), CERS3 (ceramida sintase 3), ANTXR1 (receptor de toxina de antraz 1), B3GALT6 (UDP-Gal: betaGal beta 1,3 galactosyltransferase polipeptídeo 6), DSG4 (desmogleina 4), UBR1 (ubiquitina proteína ligase E3 componente n-recognin 1), CTC1 (CTS Telomere componente do complexo de manutenção 1) MBTPS2 (fator de transcrição ligado à membrana peptidase, sítio 2), UROS (uroporfirinogênio III

sintase), ABHD5 (domínio da abhidrolase contendo 5), NOP10 (ribonucleoproteína NOP10), ALMS1 (proteína 1 da síndrome de Alstrom), LAMB3 (laminina, beta 3), EOGT (N-acetilglucosamina ligada-O ao domínio EGF específica (GlcNAc)), SAT1 (espermidina/espermina N1-acetiltransferase 1), RBPJ (proteína de ligação do sinal de recombinação para a região J kappa da imunoglobulina) ARHGAP31 (proteína ativadora de Rho GTPase 31), ACVR1 (receptor de activina A, tipo 1), IKBKG (inibidor do promotor do gene de polipeptídeo leve de kappa em células B, quinase gama), LPAR6 (receptor de ácido lisofosfatídico 6), HR (crescimento do cabelo associado), ATR (serina/ treonina quinase ATR), HTRA1 (Htra serina peptidase 1), AIRE (regulador autoimune), BCS1L (BC1 (síntese de ubiquinol-citocromo c redutase)), MCCC2 (metilcrotonoil-CoA carboxilase 2 (beta)), DKC1 (disqueratose congenital 1, disquerina), PORCN (homólogo de porcupina), EBP (proteína de ligação a emopamil (isomerase de esterol)), SLITRK1 (SLIT e família de tipo NTRK, membro 1), BTK (Bruton agamaglobulinemia tirosina quinase), DOCK6 (dedicador de citoquinase 6), APCDD1 (adenomatose polipóptica coli regulada para baixo 1), ZIP4 (precursor do transportador de zinco 4), CASR (receptor de detecção de cálcio), TERT (transcritase reversa de telomerase), EDARADD (domínio de morte associado a EDAR (receptor de ectodisplasina-A)), ATP6VOA2 (ATPase, transportando H⁺, lissomal V0 subunidade a2), PVRL1 (receptor de poliovírus 1-relacionado (mediador de entrada de herpesvírus C)), MGP (proteína de matriz Gla), KRT85 (queratina 85, tipo II), RAG2 (gene de ativação de recombinação 2), RAG-1 (gene de ativação de recombinação 1), ROR2 (receptor de órfão

semelhante a tirosina quinase receptora 2), CLAUDIN1 (claudina 7), ABCA12 (cassete de ligação a ATP, subfamília A (ABC1), membro 12), SLA-DRA1 (MHC classe II DR-alfa), B4GALT7 (xilosilproteína beta 1,4-galactosiltransferase, polipeptídeo 7), COL7A1 (colágeno tipo VII, alfa 1), NHP2 (NHP2 ribonucleoproteína), GNA11 (proteína de ligação a nucleotídeos de guanina (proteína g), alfa 11 (classe Gq)), WNT5A (membro de família de sítio de integração MMTV tipo sem asas 5A), USB1 (U6 snRNA biogênese 1), LMNA (lâmina A/C), EPS8L3 (EPS8-tipo 3), NSDHL (NAD (P) tipo dependente de esteroide desidrogenase), TRPV3 (canal de cátion potencial do receptor transiente subfamília V, membro 3), KRAS (homólogo de oncogene viral de sarcoma de rato de Kirsten), TINF2 (fator nuclear 2 interagindo com TERF1), TGM1 (transglutaminase 1), DCLRE1C (reparo de reticulação de DNA 1C), PKP1 (placofilina 1), WRAP53 (repetição contendo antissentido para TP53), KDM5C (desmetilase 5C específica da lisina (k), ECM1 (proteína da matriz extracelular 1), TP63 (proteína tumoral p63), KRT14 (queratina 14), RIPK4 (serina-treonina quinase 4 que interage com o receptor), PRKDC (proteína quinase, DNA ativado, polipeptídeo catalítico), BCL11a (célula B CLL/linfoma 11A (proteína de dedo de zinco)), BMI1 (proto-oncogene BMI1, dedo anelar de polycomb), CCR5 (receptor 5 de quimioquina (motivo C gene/pseudogene)), CXCR4 (receptor 4 de quimioquina (motivo C-X-C)), DKK1 (inibidor da via de sinalização de dickkopfWNT 1), ETV2 (variante ets 2), FLI1 (proto-oncogene Fli-1, fator de transcrição ETS), FLK1 (receptor de domínio de inserto quinase), GATA2 (proteína 2 de ligação GATA), GATA4 (proteína 4 de ligação GATA), HHEX (homeobox expressa

hematopoiética), KIT (kit oncogene), LMX1A (fator de transcrição 1 alfa de homeobox LIM), MYF5 (fator miogênico 5), MYOD1 (diferenciação miogênica 1), MYOG (miogenina), NKX2-5 (homeobox 5 de NK2), NR4A2 (subfamília de receptores nucleares 4, grupo A, membro 2), PAX3 (caixa pareada 3), PDX1 (homeobox 1 pancreático e duodenal), PITX3 (fator de transcrição 3 homeodomínio tipo pareada), RunX1 (fator de transcrição 1 relacionado com runt), RAG2 (gene de ativação de recombinação 2), GGTA (cefalosporina acilase/gama glutamiltranspeptidase bifuncional), HAND1 (proteína 2 expressa com derivado da crista cardíaca e neural), TBX5 T-box 5), ETV2 (ets variante 2), PDX1 (homeobox 1 pancreático e duodenal, TBX4 (T-box 4), ID2 (inibidor da ligação de DNA 2), SOX2 (SRY (região de determinação de sexo Y) - box 2), TTF11NKX2-1 (NK2 homeobox 1), MESP1 (mesoderma posterior 1), NKX2-5 (NK2 homeobox 5), FAH (fumarilacetoacetato hidrolase), PRKDC (proteína quinase, DNA ativado, polipeptídeo catalítico), RUNX1 (fator de transcrição 1 relacionado a run), FLI1 (proto-oncogene fli-1, fator de transcrição ETS), PITX3 (fator de transcrição 3 de homeodomínio tipo pareado), LMX1A (fator de transcrição 1 alfa de homeobox LIM), DKK1 (inibidor de via de sinalização WNT de dickkopf 1), NR4A2/NURR1 (subfamília 4 de receptor nuclear, grupo A, membro 2), FLK1 (receptor de domínio de inserção de quinase), HHEX1 (proteína HHEX hematopoieticamente expressa homeobox), BCL11A (células B CLL/linfoma 11A (proteína dedo de zinco), RAG2 (gene de ativação 2 da recombinação), RAG1 (gene de ativação 1 da recombinação), IL2RG (receptor 2 de interleucina, cadeia gama), c-KIT/SCFR (v-kit hardy-Zuckerman 4 homólogo de

oncogene viral do sarcoma felino), BMI1 (BMI1 proto-oncogene polycomb dedo do anel), TBX5 (T-box 5), OLIG1 (fator de transcrição de oligodendrócito 1), OLIG2 (fator de transcrição de oligodendrócito 2), heterozigotos dos mesmos, homozigotos dos mesmos, e suas combinações.

33. Um método de fazer nocautes de genes multiplex em uma célula primária de vertebrado ou embrião compreendendo a introdução na célula ou embrião de uma pluralidade de TALENs alvos para diferentes genes alvo em uma presença de modelos de HDR com homologia com os referidos genes alvo diferentes.

34. Um método de fazer um animal compreendendo qualquer um de 1 a 33 e compreendendo ainda clonagem da célula ou colocação do embrião em uma mãe gestacional.

35. Animal feito por um método de qualquer de 1 a 34.

36. Animal ou embrião quimérico feito pelo método de qualquer de 1 a 34 em que a célula é editada e adicionalmente compreendendo a clonagem da célula, fazendo um embrião hospedeiro a partir da célula, e adição de uma célula doadora ao embrião hospedeiro para formar o embrião quimérico.

37. Embrião de vertebrado quimérico para células hospedeiras e células doadoras compreendendo

um embrião hospedeiro com uma pluralidade de edições genéticas de células hospedeiras em diferentes sítios de DNAs cromossômicos, e

uma célula dadora integrada com as células hospedeiras para formar o embrião quimérico.

38. Um portador de deficiência de vertebrado compreendendo um embrião com uma pluralidade de edições genéticas multiplex em diferentes sítios de genes de DNA

cromossômico as edições proporcionando um nicho genético para complementação por células doadoras.

39. O embrião ou portador de qualquer de 37 a 38 em que as células doadoras são células tronco embrionárias, células tronco pluripotentes, blastômeros e semelhantes a partir de primatas, roedores ou artiodáctilo.

40. O embrião de qualquer de 37 a 39 em que as edições genéticas de células hospedeiras ou portadoras compreendem um nocaute de um gene ou uma substituição de um alelo nativo com um alelo exógeno de outra raça de vertebrado ou outra espécie de animal.

41. O embrião de qualquer de 37 a 41 em que um número das edições genéticas de células hospedeiras é, ou está em pelo menos, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

42. O embrião de qualquer de 37 a 41 em que um número de substituições de um alelo nativo com um alelo exógeno de outra raça de vertebrado ou outra espécie de animal é, ou é pelo menos, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

43. O embrião de qualquer de 37 a 42 em que o embrião está livre de genes repórteres expressíveis e/ou genes sintéticos e/ou proteínas fluorescentes exógenas.

44. O embrião de qualquer de 37 a 43 em que todas as edições de genes são bi-alélicas, pelo menos 2, 3, 4 ou 5 das edições são bi-alélicas, em que pelo menos 2, 3, 4 ou 5 das edições de genes são monoalélicas, ou qualquer combinação das mesmas.

45. O embrião de qualquer de 37 a 44 com a célula doadora sendo um complemento às células hospedeiras.

46. O embrião de qualquer de 37 a 45 em que o embrião hospedeiro é destinado a um fenótipo de insuficiência de crescimento (FTT).

47. O embrião de 46 em que a célula dadora resgata o embrião do fenótipo FTT.

48. O embrião de qualquer de 37 a 47 em que a célula doadora compreende uma ou mais edições genéticas.

49. O embrião de qualquer de 37 a 47 sendo selecionado do grupo que consiste de vertebrado grande, gado, símio, cão, gato, aviário, pássaro, peixe, coelho, porco, bovino, búfalo, cabra, ovelha e artiodáctilo.

50. Um animal vertebrado quimérico para células hospedeiras e células doadoras compreendendo uma pluralidade de edições genéticas de células hospedeiras em diferentes sítios de DNA cromossômico e uma célula doadora integrada com as células hospedeiras para formar o animal quimérico.

51. O animal de 50 sendo selecionado do grupo consistindo de vertebrados grandes, gado, símio, cão, gato, aviário, pássaro, peixe, coelho, porco, bovino, búfalo, cabra, ovelha e artiodáctilo.

52. Um método para fazer um embrião de vertebrado quimérico para células hospedeiras e células dadoras compreendendo:

introdução em uma célula hospedeira vertebrada:

uma primeira endonuclease alvo dirigida a um primeiro sítio de DNA cromossômico alvo e um primeiro modelo de reparo dirigido por homologia (HDR) homólogo à primeira sequência de sítio alvo;

uma segunda endonuclease alvo dirigida a um segundo DNA cromossômico alvo um segundo modelo de HDR homóloga a segunda sequência de local alvo,

com a primeira sequência de modelo de HDR substituindo a sequência de DNA cromossômico nativa no primeiro sítio alvo e a segunda sequência de modelo de HDR substituindo a sequência de DNA cromossômico nativa na segunda sequência de local alvo,

clonagem da célula para desenvolver um embrião hospedeiro, e

colocação de uma célula doadora no embrião hospedeiro.

53. O método de 52 em que a célula é uma célula primária.

54. O método de qualquer de 52 a 53 sendo selecionado do grupo que consiste de vertebrado grande, gado, símio, cão, gato, aviário, pássaro, peixe, coelho, porco, bovino, búfalo, cabra, ovelha e artiodáctilo.

55. O método, célula, embrião ou animal de qualquer de 1 a 54 estando isento de genes repórter expressíveis e/ou genes sintéticos e/ou proteínas fluorescentes exógenas.

56. Um animal vertebrado grande quimérico compreendendo células hospedeiras e células doadoras, com as células hospedeiras compreendendo pelo menos um gene não meiótico editado a um gene gametogênico ou espermatogênico que é complementado por um gene das células doadoras, com o animal compreendendo gametas com um genótipo das células doadoras.

57. O animal de 56 estando livre de gametas funcionais com um genótipo das células hospedeiras.

58. Um animal vertebrado grande quimérico compreendendo células hospedeiras e células doadoras, com as células

hospedeiras compreendendo pelo menos uma edição de genes não meióticos para estabelecer um genótipo de célula hospedeira com insuficiência de crescimento (FTT), sendo o genótipo FTT complementado pelas células doadoras.

59. O animal de 58 em que as células hospedeiras compreendem uma pluralidade de edições de genes não meióticos para estabelecer um genótipo de célula hospedeira de insuficiência de crescimento (FTT).

60. O animal de qualquer de 58 ou 59 em que o fenótipo FTT é imunodeficiência.

61. Um animal vertebrado grande compreendendo edições de genes multiplex.

62. O animal de 61 sendo uma primeira raça de porco ou uma primeira raça de bovino que tem pelo menos três alelos nativos substituídos com os correspondentes alelos exógenos de uma segunda raça ou outra espécie, referidos alelos exógenos sendo um substituto do correspondente alelo nativo sem recombinação meiótica, em que o animal está isento de genes marcadores exógenos.

63. O animal de 61 ou 62 compreendendo pelo menos três, quatro, cinco, seis ou sete dos referidos alelos de substituição exógenos, cada um sem recombinação meiótica.

64. O animal de qualquer de 61 a 63 sendo selecionado do grupo que consiste de gado, símio, cão, gato, aviário, pássaro, peixe, coelho, porco, bovino, búfalo, cabra, ovelha e artiodáctilo.

65. O animal de qualquer de 61 a 64 tendo um número de edições de 3 a 25.

66. O animal de qualquer de 61 a 65 sendo uma geração F0 com respeito às edições multiplex.

67. O animal de qualquer de 61 a 66 tendo um número de substituições de alelos de 2 a 25.

68. O animal de qualquer de 61 a 67 tendo um número de edições de gene KO de 2 a 25.

69. O animal de 61 sendo uma primeira raça de suíno ou uma primeira raça de bovino que tem pelo menos três alelos nativos substituídos por alelos exógenos correspondentes de uma segunda raça ou de outra espécie, os referidos alelos exógenos sendo uma substituição do alelo nativo correspondente sem recombinação meiótica, em que o animal está isento de genes marcadores exógenos.

70. O animal de 69 compreendendo pelo menos três, quatro, cinco, seis ou sete dos referidos alelos de substituição exógenos, cada um sem recombinação meiótica.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de fazer edições de genes multiplex em uma célula de vertebrado ou de embrião primário não-humano, **caracterizado** pelo fato de que compreende a introdução na célula ou embrião de uma pluralidade de TALENS direcionadas para diferentes genes alvo na presença de modelos de reparo dirigido por homologia (HDR) com homologia para os referidos genes alvo diferentes.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a pluralidade de TALENs é codificada por RNA mensageiro (mRNA).

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a pluralidade de TALENs compreende proteína.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende ainda a introdução de endonucleases guiadas por RNA (RGENs) na célula ou no embrião.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que os genes alvos são selecionados a partir de NKX-2, GATA4, MESP1, RAG2, IL2Rg, IL2Rγ, APC, TP53, LDLR, KISSR, GPR54, EIF4GI, p53 e RELA.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que as edições de genes compreendem inserções ou deleções (indels) ou substituições.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que as edições de genes são simultâneas.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que a célula ou o embrião é homozigoto para as edições de genes.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que a célula ou o embrião é heterozigoto para as edições de genes.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que os modelos HDR compreendem oligonucleotídeos.

GERAÇÃO DE GADO HOMOZIGÓTICO EDITADO EM UM ALELO USANDO EDIÇÕES ÚNICAS

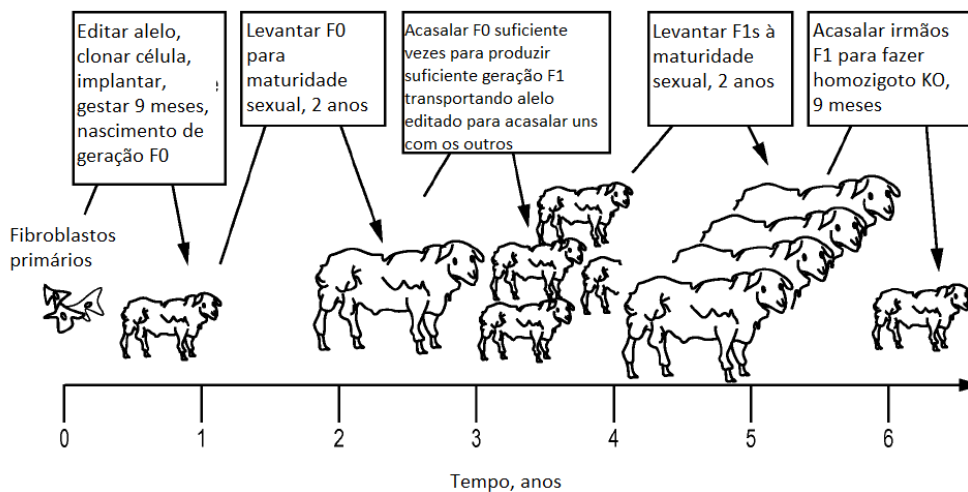


FIG. 1A

GERAÇÃO DE GADO GENETICAMENTE EDITADO EM ALELOS MÚLTIPLOS USANDO EDIÇÕES ÚNICAS

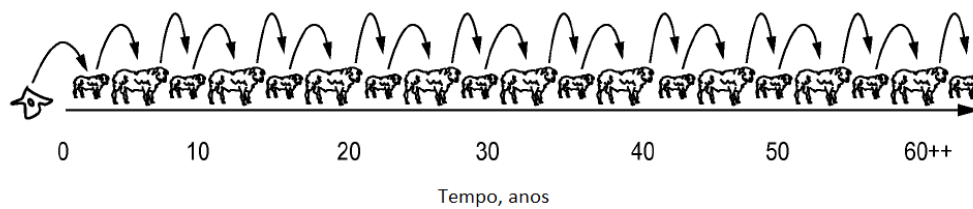
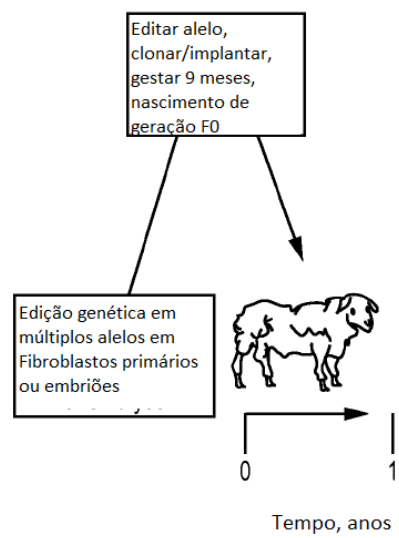
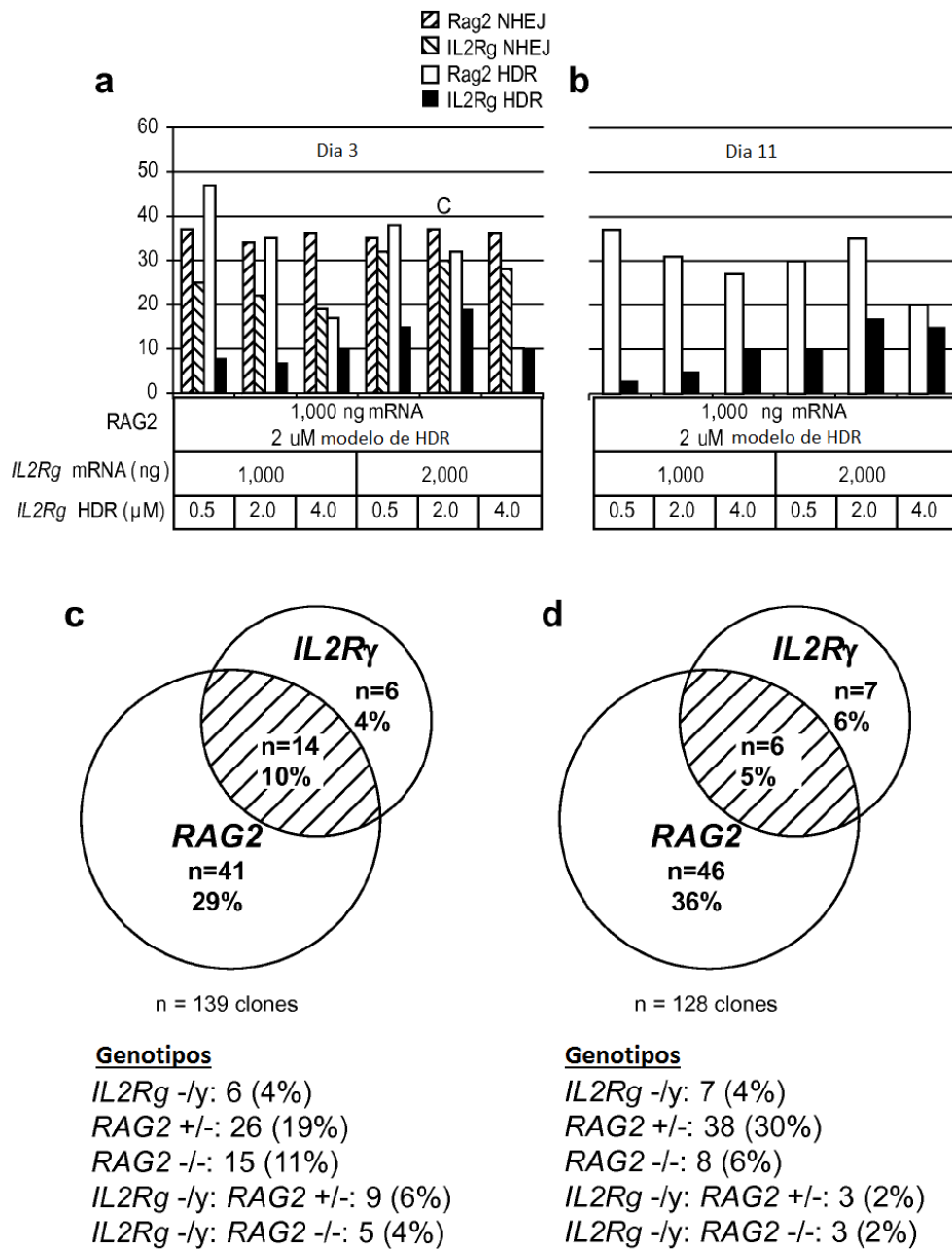


FIG. 1B

GERAÇÃO DE GADO HOMOZIGÓTICO EDITADO EM ALELOS MÚLTIPLOS

**FIG. 2**



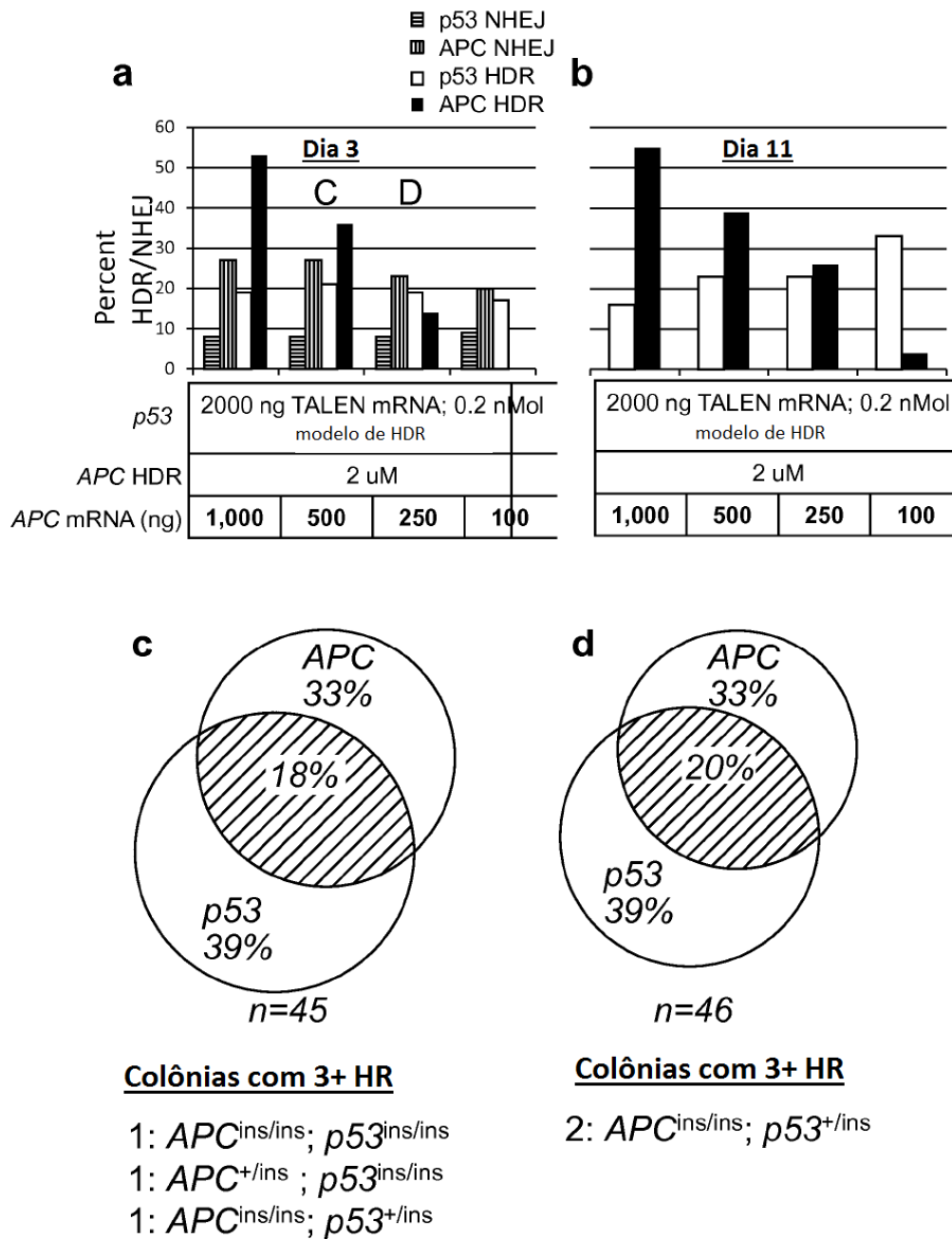


FIG. 4

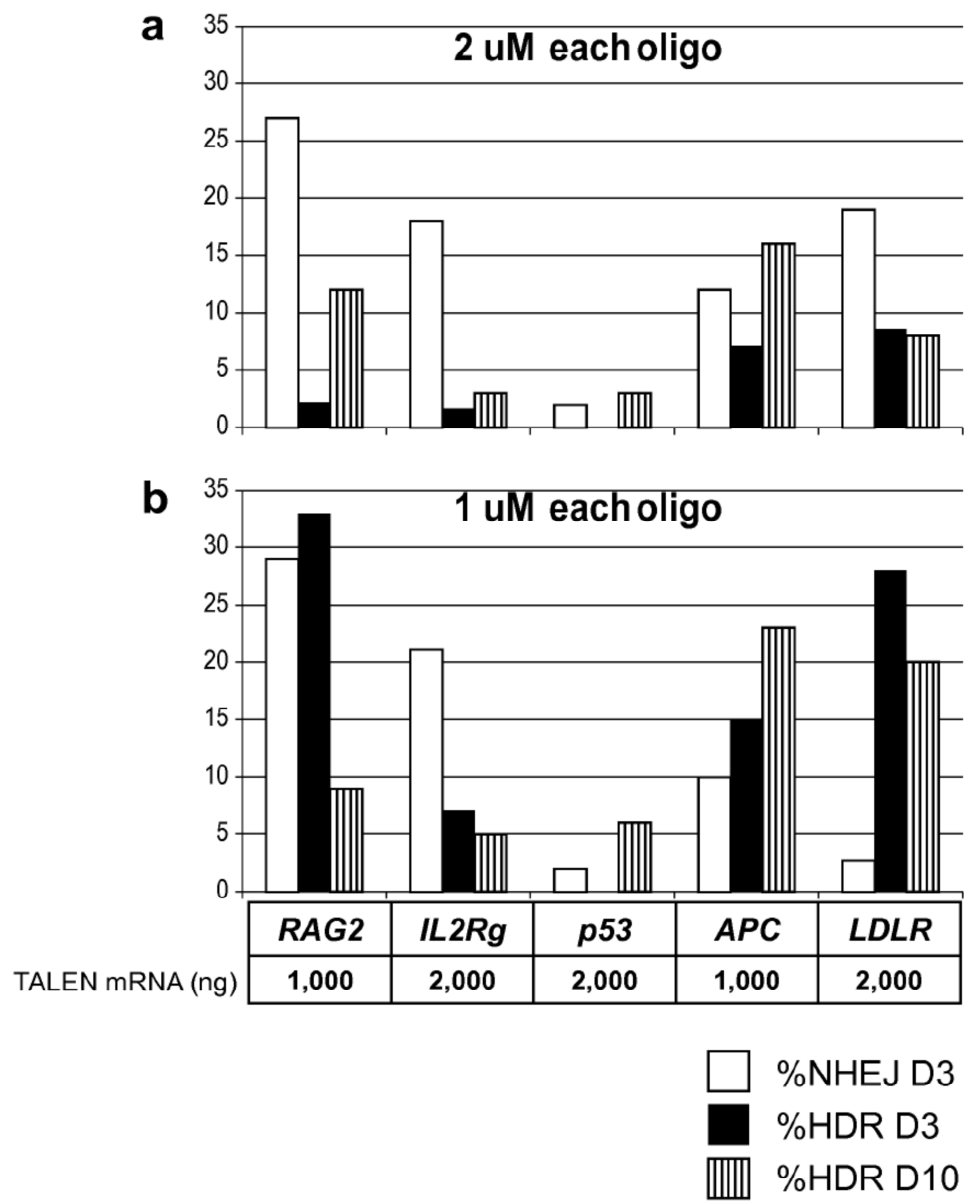
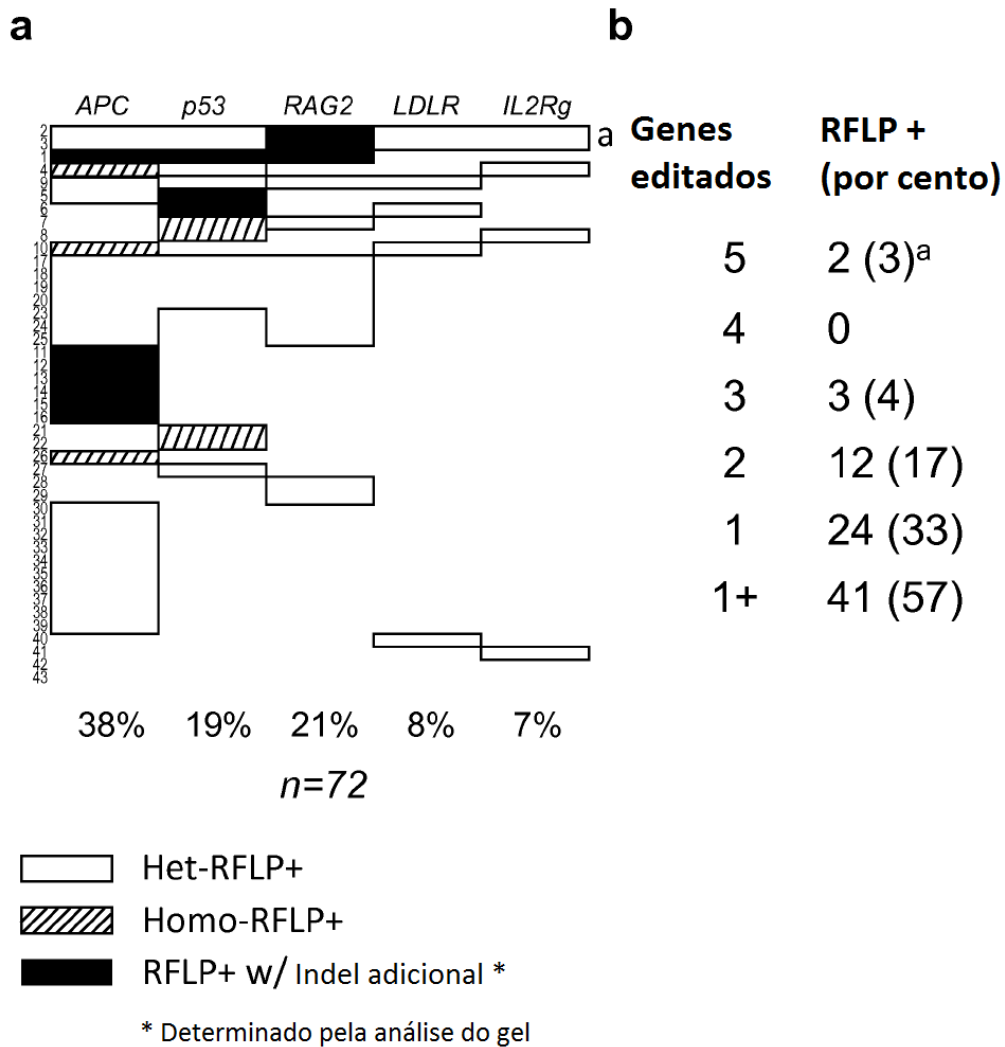
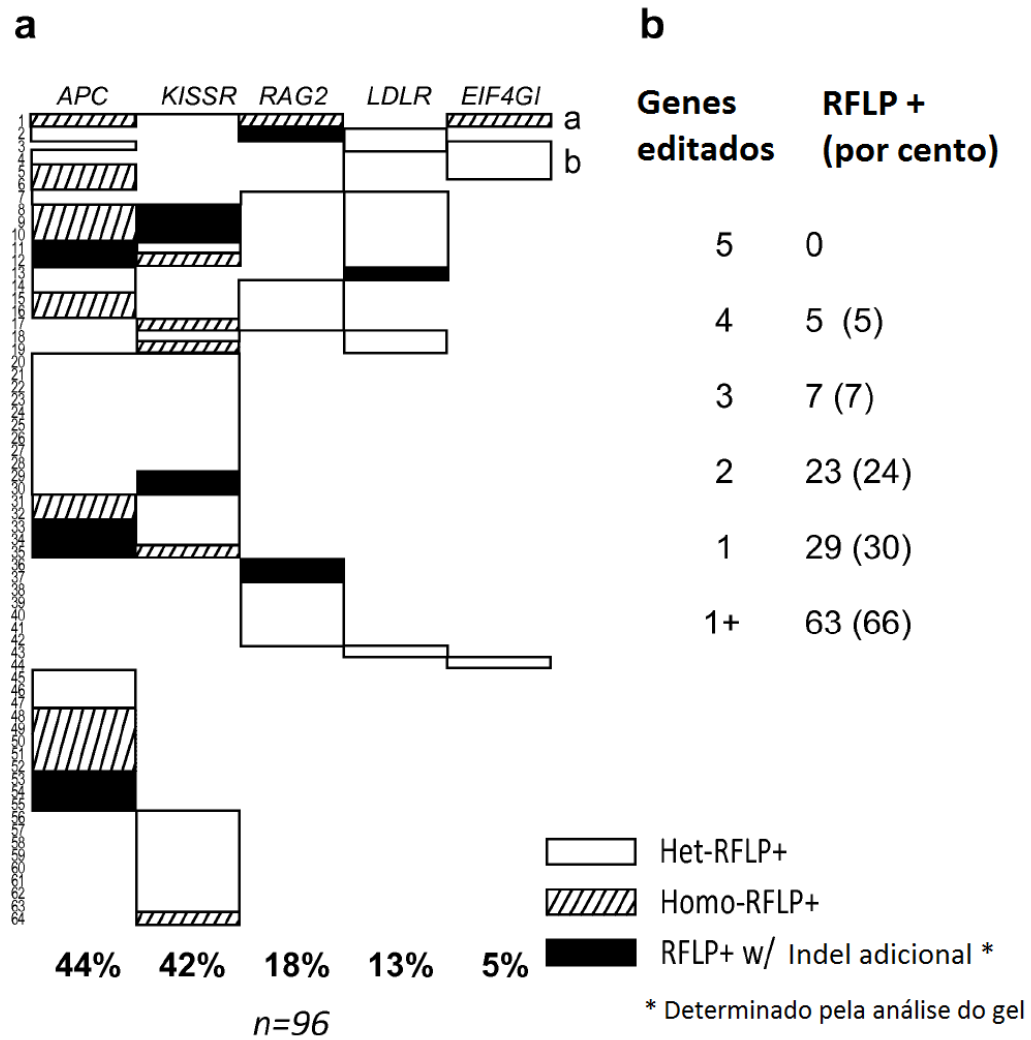


FIG. 5



a- probabilidade do genótipo é 0,001 por cento. Predição binomial para derivação independente deste genótipo é $K \geq 2$; $p < 2,55 \text{ E-}7$ ou 0,000026%

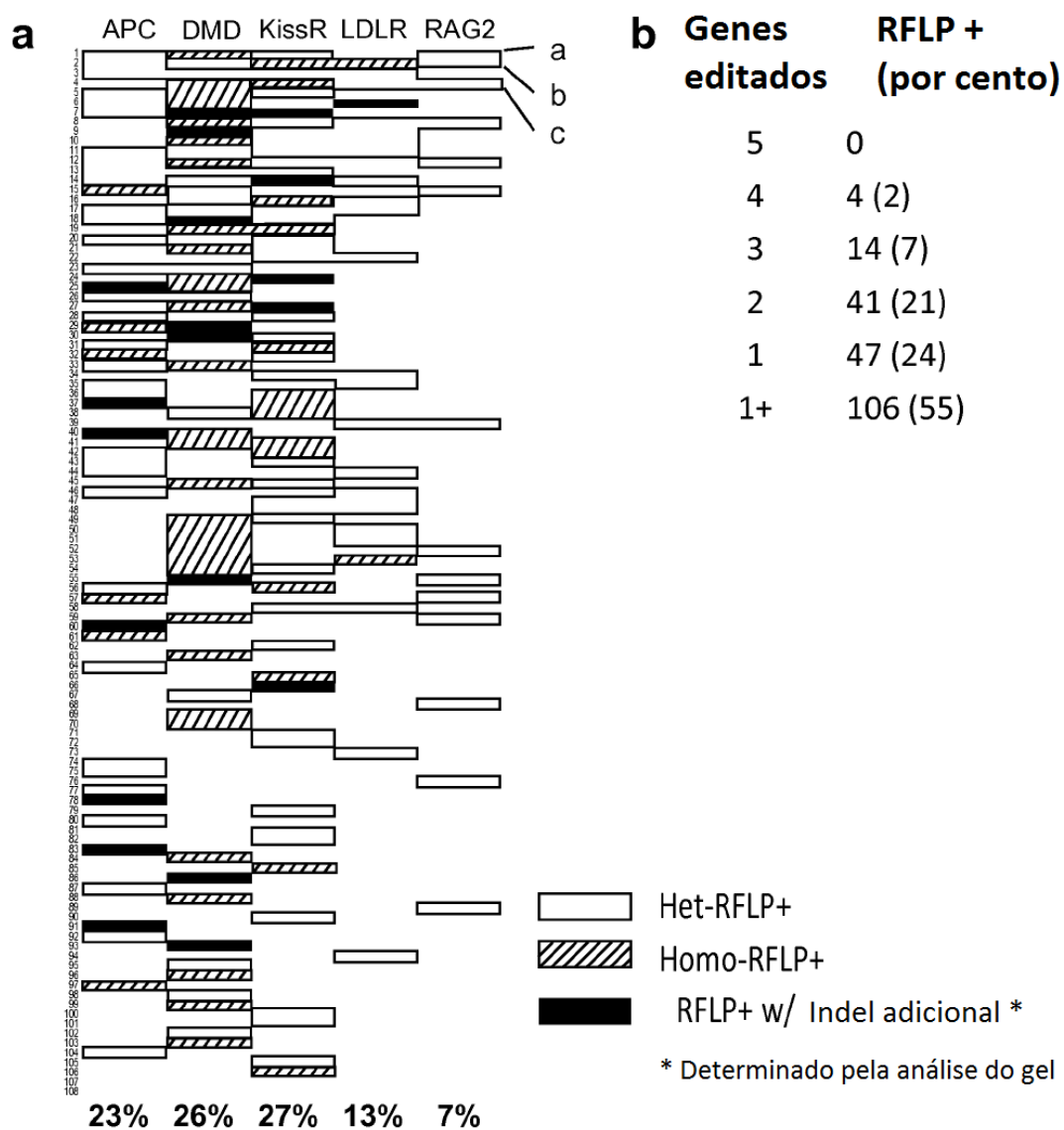
FIG. 6



a- Probabilidade deste genótipo 0,0000066%; $K \geq 1$; $p = 0,067$ ou 6,7%

b. Linha 5; probabilidade do genótipo 0,00073; $K \geq 1$; $p = 0,067$ ou 6,7%

FIG. 7



- a- Probabilidade da linha de topo de sucesso = 0,001 (0,1%). $K \geq 1$; $p = 0,17$; 17%
- b- Segunda linha: probabilidade de sucesso 0,00002. $K \geq 1$; $p = 0,0019$; ou 0,19%
- c- Quarta linha: probabilidade de sucesso 0,0025. $K \geq 1$; $p = 0,38$; ou 38 por cento

FIG. 8

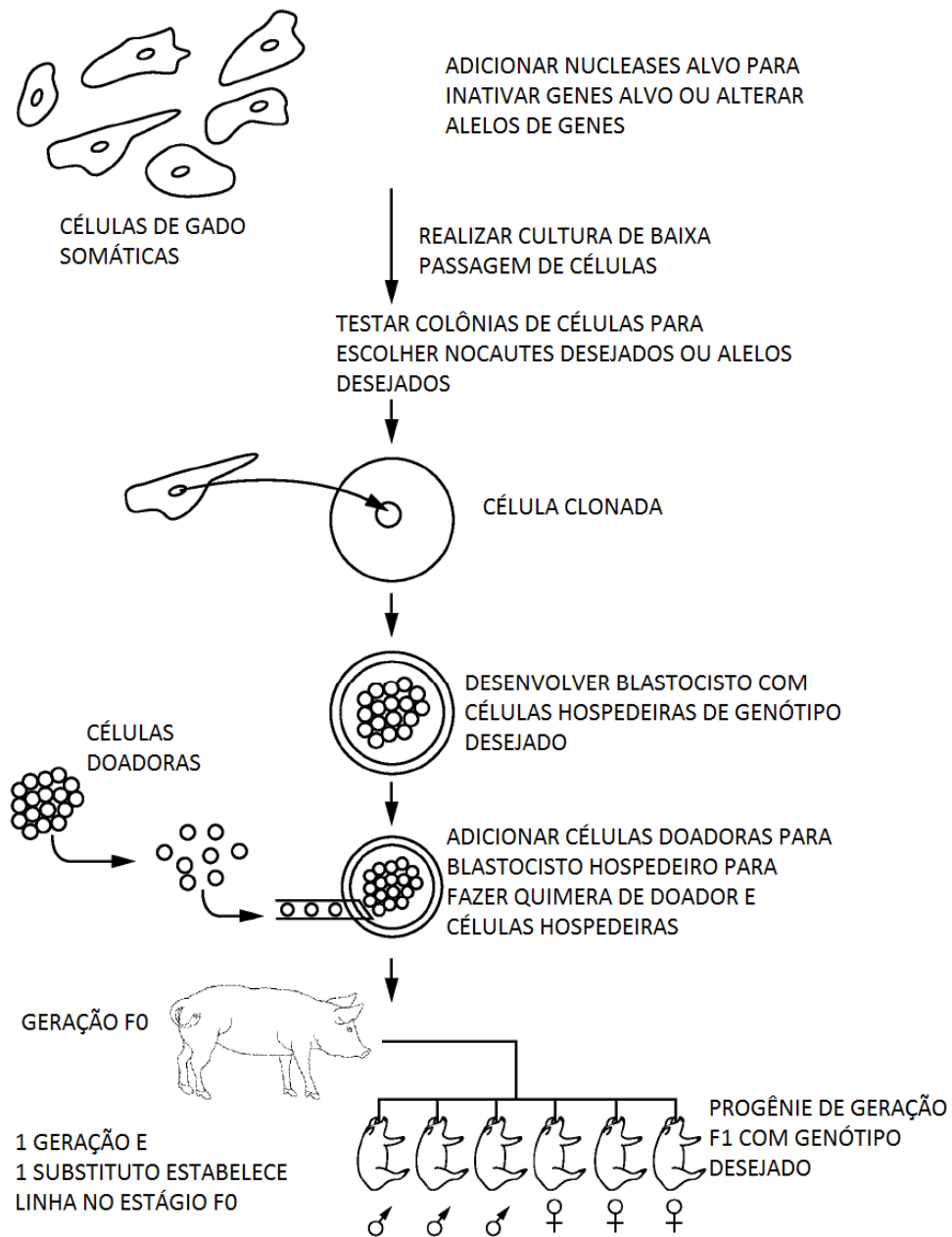


FIG. 9

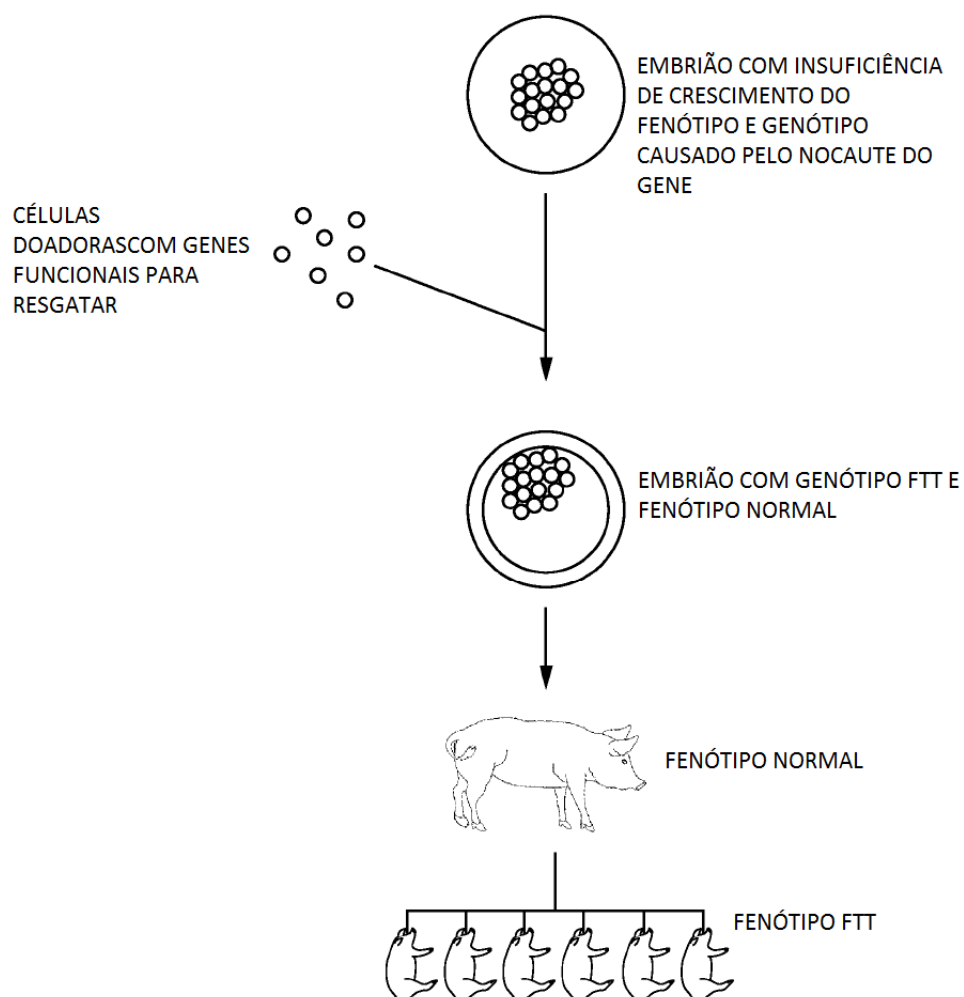


FIG. 10

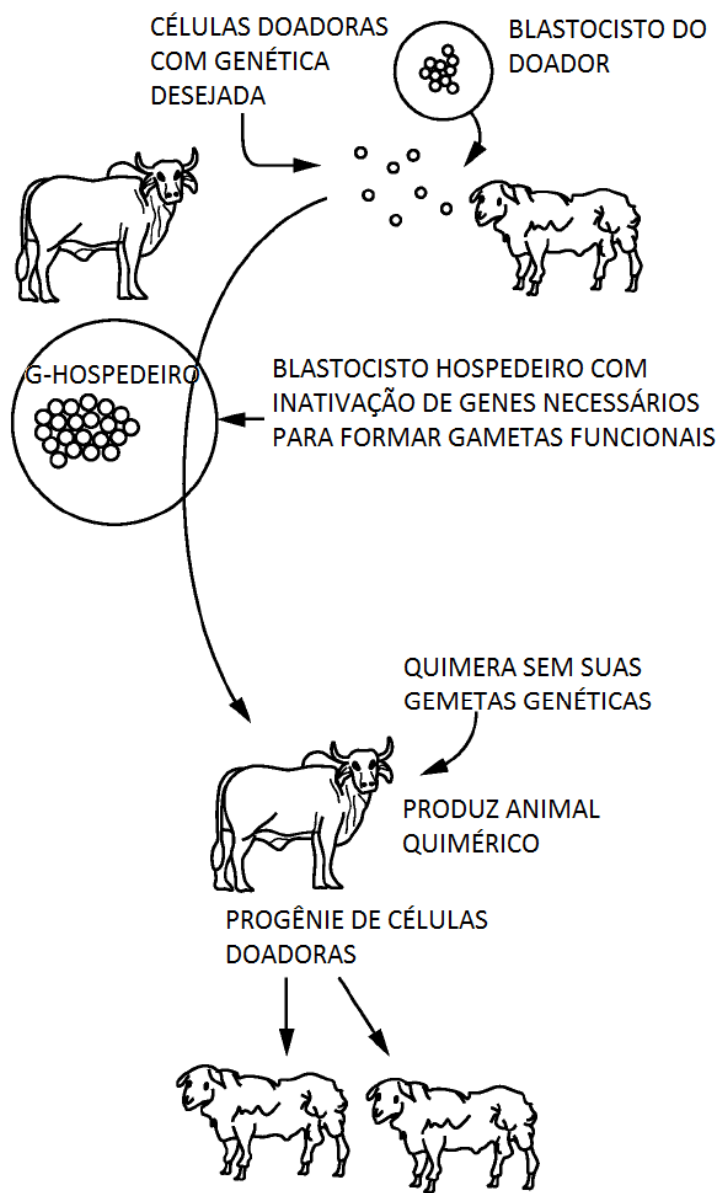


FIG. 11

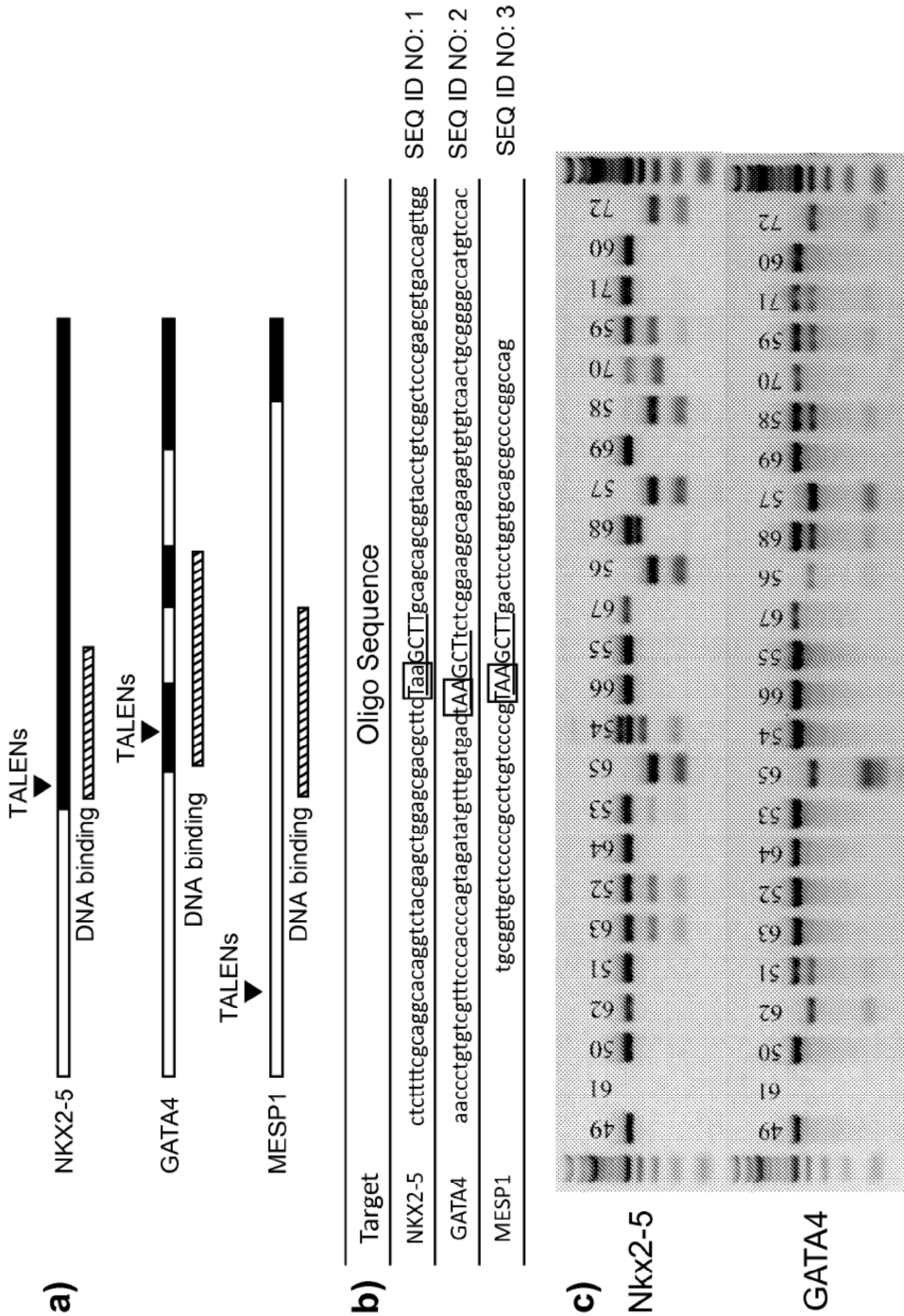


FIG. 12

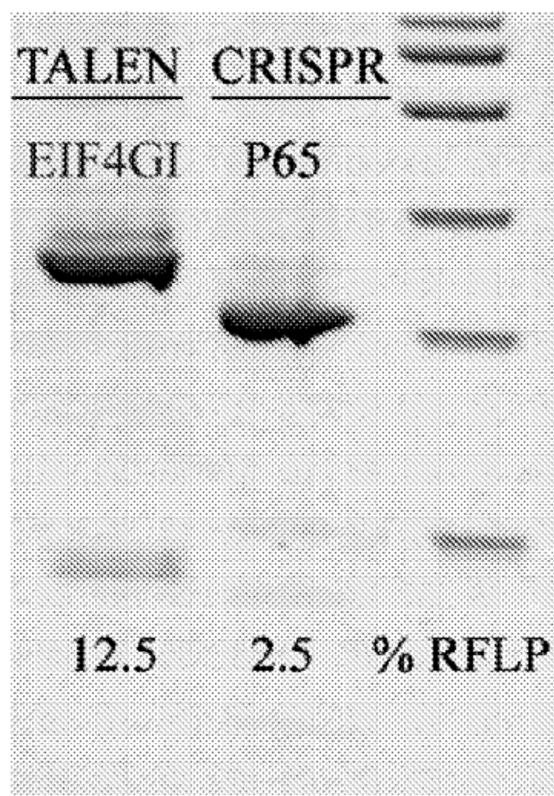


FIG. 13

RESUMO

**MÉTODO DE FAZER EDIÇÕES DE GENES MULTIPLEX EM UMA CÉLULA DE
VERTEBRADO OU DE EMBRIÃO PRIMÁRIO NÃO-HUMANO**

Materiais e métodos para fazer edições de genes em células multiplex são apresentados. Outros métodos incluem animais e métodos para a preparo dos mesmos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 1220230232119_Listagem_Novo Título (emendas do
- Data de Geração do Código: 04/01/2024
- Hora de Geração do Código: 20:40:22
- Código de Controle:
 - Campo 1: 1B595D70347D1D86
 - Campo 2: 59856A5020AF9C72