

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 401**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/877 (2010.01)

C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2014** **PCT/KR2014/010896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015** **WO15072760**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2014** **E 14862841 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023** **EP 3068217**

54 Título: **Vector de modificación genética dirigida del gen activador de la recombinación 2, producción de cerdos enanos de tipo SCID mediante modificación genética dirigida mediada por TALEN y uso de los mismos**

30 Prioridad:

13.11.2013 KR 20130137677

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2023

73 Titular/es:

KIM, JIN-HOI (50.0%)
201-808 Samsung Raemian Apt. 128 Pungseong-ro Gangdong-gu
Seoul 134-758, KR y
THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF
MISSOURI (50.0%)

72 Inventor/es:

KIM, JIN-HOI;
KWON, DEUG-NAM;
PRATHER, RANDALL S. y
LEE, KIH0

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 935 401 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vector de modificación genética dirigida del gen activador de la recombinación 2, producción de cerdos enanos de tipo SCID mediante modificación genética dirigida mediada por TALEN y uso de los mismos

Campo técnico

La presente invención se refiere a un vector de modificación genética dirigida de Rag-2 (gen activador de la recombinación 2), a un método para producir cerdos enanos de tipo SCID (del inglés *severe combined immunodeficiency*, inmunodeficiencia combinada grave) a los que se les ha introducido el vector, y a un uso de los mismo.

Antecedentes de la técnica

Una inmunodeficiencia combinada grave (en lo sucesivo en el presente documento denominado "SCID") se produce en los seres humanos (Buckley, R.H. *Annual review of immunology* 22, 625-655 (2004)). No obstante, todavía no se ha desarrollado un medicamento para tratar la SCID debido a los limitados modelos animales que reflejen un tipo de SCID humano. Un cerdo tiene propiedades fisiológicas muy similares a las de los seres humanos y una mayor similitud en comparación con los modelos de roedores, que se han diseñado para copiar muchas enfermedades humanas (Whyte, J. J. y Prather, R.S. *Molecular reproduction and development* 78, 879-891(2011)). Por lo tanto, un cerdo SCID puede ser representativo de los modelos que han sido diseñados para copiar enfermedades humanas. Además, los modelos de SCID pueden utilizarse para la investigación del cáncer, del trasplante de células y en el estudio de desarrollo de fármacos.

El gen activador de la recombinación 2 (en lo sucesivo en el presente documento denominado "RAG2", del inglés *recombination activating gene 2*) está implicado en las enfermedades de SCID relacionadas con autosomas en seres humanos (Villa, A., Santagata, S., Bozzi, F., Imberti, L. y Notarangelo, L.D. *Journal of clinical immunology* 9, 87-97 (1999)). Una mutación en RAG2 provoca daño a los linfocitos B y T, y, dado que el RAG2 es importante para el reordenamiento de V(D)J, destruye el sistema inmunitario adaptativo (Shinkai, Y. *et al. Cell* 68, 855-867 (1992)). La técnica anterior proporciona modelos animales, por ejemplo, Watanabee *et al.*, *PLoS One*, vol. 9, n.º 10, pág. e76478 (2013) describen la generación de cerdos genosuprimidos para el gen del receptor de interleucina 2 gamma mediante la mutación del gen de ILR2 usando Nucleasa de dedo de zinc (ZNF, del inglés *Zinc Finger Nuclease*). Además de eso, Song *et al.*, *Cell Research*, 1059-1062 (2013) divulga la provisión de un modelo de conejo con inmunodeficiencia mediante la mutación de RAG1 o RAG2, usando ZFN.

[Bibliografía de patentes]

Bibliografía de patente 1: Publicación pública de patente coreana n.º 1020040074108

Divulgación de la invención

Problema técnico

Para resolver los problemas anteriores, un objeto de la presente invención es proporcionar un método eficaz para producir un cerdo modificado por ingeniería genética que provoque un fenotipo de SCID.

Solución al problema

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un método para producir cerdos enanos de tipo SCID que tienen una mutación bialélica del gen activador de la recombinación (RAG) 2, en el que el método incluye inducir una mutación bialélica dirigiendo una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN, del inglés *transcription activator-like effector nuclease*) a una región de secuencia que reconoce TALEN como se expone en la SEQ ID NO: 1 en el cromosoma 2 de un cerdo (*Sus scrofa*), y produciendo los embriones mutantes usando las células con la mutación bialélica inducida para el trasplante nuclear de células somáticas.

De acuerdo con una realización de la presente invención, es preferible inducir la mutación alélica mediante la transfección de las células de interés utilizando TALEN en un tipo de vector que codifique una nucleasa de ADN efectora de TAL (del inglés *transcription activator-like*, tipo activador de la transcripción), pero la presente invención no se limita a ello.

Además, la presente invención proporciona cerdos enanos de tipo SCID que tienen una mutación bialélica del gen activador de la recombinación 2, que se produce mediante el método de la presente invención.

Además, la presente solicitud divulga un método para separar las células positivas para RFP, GFP y H-2KK como las células con el gen activador de la recombinación (RAG) 2 objetivo, en el que el método incluye la introducción del vector que codifica una nucleasa de ADN efectora de TAL capaz de inducir las mutaciones de la región génica de

interés o los sitios circundantes mediante el reconocimiento de la secuencia que reconoce TALEN como se expone en la SEQ ID NO: 1 en el cromosoma 2 de un cerdo (*Sus scrofa*), y un vector indicador que incluye un gen de la proteína roja fluorescente (RFP) monomérica, una secuencia de direccionamiento de la nucleasa programable como se expone en la SEQ ID NO: 1, un gen potenciador de la proteína verde fluorescente (GFP) y un gen de H-2KK, juntos en las células.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, es preferible realizar la detección de H-2KK mediante un anticuerpo, pero la presente divulgación no se limita a ello.

De acuerdo con otra realización de la presente divulgación, es preferible detectar las expresiones de RFP y GFP mediante citometría de flujo, pero la presente divulgación no se limita a ello.

Además, la presente invención proporciona las células de cerdo que tienen la mutación bialélica de RAG 2 mediante la inducción de la mutación alélica mediante el tratamiento de una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) en una región de secuencia que reconoce TALEN como se expone en la SEQ ID NO: 1 en el cromosoma 2 de un cerdo (*Sus scrofa*).

Las células se depositaron en el banco de genes (Colección Coreana de Cultivos Tipo) en el Instituto de Investigación de Biociencia y Biotecnología de Corea, ubicado en Yuseong-gu, Daejeon, Corea del Sur, el 2 de octubre de 2013, con el número de referencia: KCTC 12496BP.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá la presente invención.

En la presente invención, los presentes inventores informan sobre un método eficaz para producir dos tipos de cerdos modificados por ingeniería genética, provocando un fenotipo de SCID mediante el uso de modificación genética dirigida mediada por TALEN (nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción), que incluye un trasplante nuclear de células somáticas (SCNT, del inglés *somatic cell nuclear transplantation*).

Para dirigirse a RAG2 de cerdo, se diseñaron y sintetizaron las TALEN específicas en Toolgen (Seúl, Corea del Sur). Las TALEN se diseñaron para provocar mutaciones en el exón 2 de RAG2 (Fig. 1a). Se usó un indicador que contenía sitios de reconocimiento de TALEN para identificar las células que expresaban correctamente juegos de TALEN (Fig. 3 y 1b). La actividad de las TALEN diseñadas se validó introduciendo los juegos de TALEN con un indicador en células HEK 293T (Fig. 1c). Después de la validación, las construcciones que codifican TALEN y un indicador se introdujeron en fibroblastos de cerdo mediante electroporación. Después de 48 horas, las células se separaron en cuanto a células positivas para GFP (Fig. 4) y se sembraron en placas de 96 pocillos; una única célula en un pocillo. Después de 10 días, las células se pasaron y la mitad de las células se usaron para genotipado. La secuenciación de pequeños fragmentos de PCR (aproximadamente 400 pb) que flanquean los 52 sitios de corte de TALEN previstos reveló la presencia de indeles de las TALEN en los grupos de RAG2; se examinaron un total de 57 colonias para RAG2 (véase la información de cebadores enumerada en la Tabla 1). La eficacia de la modificación genética dirigida fue del 42,1 % (24/57) para RAG2 (Fig. 1d). Se observó un 14 % (8/57) de modificación bialélica en las células inducidas con los TALEN para RAG2. La eficacia de la modificación genética dirigida fue del 42,1 % (24/57) con respecto a RAG2. Las TALEN utilizadas en la presente invención eran específicas para las regiones objetivo y, por lo tanto, los inventores no observaron ningún corte inespecífico (Fig. 6 y Tabla 2). Las células que se tenían como diana confirmadas se utilizaron para transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) (Fig. 7).

Los embriones mutantes se produjeron mediante SCNT y se transfirieron 733 embriones a cuatro cerdas sustitutas. lo que dio lugar al establecimiento de cuatro embarazos de 25 días que todas gestaron hasta el final. Nacieron 13 mutantes de RAG2, además de 3 mutantes de RAG2 nacidos muertos (Fig. 1d).

Resulta interesante que los presentes inventores produjeron mutantes de RAG2 que albergan una modificación mono o bialélica de RAG2 a partir de una única colonia de células. Específicamente, todos los cerdos modificados por ingeniería genética para RAG2 compartían la misma modificación en un alelo, pero algunos cerdos tenían otra modificación en el otro alelo. Los mutantes monoalélicos tienen una delección de un solo aminoácido y una sustitución de aminoácido debido a la pérdida de tres nucleótidos (RAG2+/Z1 140, S1411-1), y los mutantes bialélicos tienen la misma modificación y la formación de un codón de terminación prematura en el otro alelo debido a la delección de catorce nucleótidos (RAG2A 140,S141H/A 140-527).

El genotipado de los *mutantes bialélicos de RAG2 (RAG24140,S141 H/4140-527)* sugirió que los mutantes pueden carecer de RAG2 funcional, ya que los aminoácidos perdidos y sustituidos están altamente conservados en diversas especies de RAG2 en una región de propulsor beta (Fig. 9).

El día 17, el tipo silvestre, los mutantes monoalélicos y los bialélicos de RAG2 se sacrificaron y se les practicó una necropsia. Si bien el timo no se detectó en los cerdos RAG24140,S141H/4140-527, se detectó un timo que tenía un tamaño similar al del tipo silvestre en los cerdos RAG2+/4140, S141H (Fig. 2a). Además, el tamaño del bazo del mutante bialélico era más pequeño que el de los cerdos de control (Fig. 2b y 2c). Estos resultados están son congruentes con los resultados observados en ratones, y se sugiere que se detecta deficiencia inmunitaria en los

cerdos RAG2+/4140,S141H.

La Inmunohistoquímica (IHQ) y la tinción con hematoxilina y eosina (H y E) del bazo de cerdos RAG24140,S141H/4140-527 revelaron que la pulpa blanca era marcadamente hipoplásica, con falta de centro germinal y de formación de vaina linfóide periarteriolar (PALS, del inglés *periarteriolar lymphoid sheath*), y linfocitos B y T raros en todas partes (Fig. 2d y 10). Por otro lado, los niveles de linfocitos B y T obtenidos de los cerdos RAG2+/4140,S141H eran normales. De forma similar, a partir de la citometría de flujo realizada utilizando leucocitos esplénicos, se demuestra que los linfocitos B y T maduros son insuficientes en los cerdos RAG24140,S141H/4140-527 (Fig. 2e). Durante el seguimiento durante 4 semanas, los presentes inventores observaron las diferencias de aumento de peso en el tipo silvestre, el mutante monoalélico y el mutante bialélico de RAG2. Todos los cerdos presentaron ganancias de peso similares durante 2 semanas, pero los pesos de los cerdos RAG24140,S141H/4140-527 se estancaron (Fig. 2f). Después de 4 semanas, el peso del mutante bialélico de RAG2 era menor que el del mutante monoalélico. Estos animales se criaron en un alojamiento no estéril específico (SPF, del inglés *specific pathogen free*, libres de patógenos específicos), y el último cerdo RAG24140,S141H/4140-527 murió a los 29 días. Los mutantes de RAG2 monoalélicos restantes estaban sanos y crecieron normalmente.

En la presente invención, los presentes inventores descubrieron que los cerdos SCID preparados mediante una SCNT pueden producirse de manera eficaz mediante una modificación genética dirigida mediada por TALEN. Mediante el uso de un vector indicador que tiene una construcción de TALEN, la mutación podría inducirse a una tasa elevada.

A diferencia de la modificación genética dirigida convencional, en que un vector de direccionamiento se integra en el genoma, esta estrategia permite a los inventores producir cerdos modificados por ingeniería genética sin que quede ningún rastro en el genoma.

Los cerdos modificados por ingeniería genética producidos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar como modelo para una investigación sobre SCID, lo que incluye un primer modelo de cerdo capaz de presentar síndrome de Omenn en seres humanos (los cerdos se pueden obtener del Centro Nacional de Investigación y Recursos Porcinos, EE. UU., <http://nsrrc.missouri.edu/>).

Para probar si los cerdos RAG24140,S141H/4140-527 sustentarían la proliferación y diferenciación de iPSC (del inglés *induced pluripotent stem cells*, células madre pluripotentes inducidas) humanas, los inventores inyectaron cerdos s.c. con células de una línea celular potencialmente pluripotente que se había generado a partir de fibroblastos de cordón umbilical humano mediante la reprogramación con vectores plasmídicos no integrativos para determinar si las células podrían originar teratomas. Antes de la inyección, las células habían sido positivas para fosfatasa alcalina y expresaron los marcadores de pluripotentes [Homeosecuencia 1 POU de clase 5 (POU5F1), Homeosecuencia Nanog (NANOG), antígeno embrionario específico de fase 3 (SSEA-3)] (Fig. 12 c-e). Debido a que los cerdos RAG24140,S141H/4140-527 estaban inmunodeprimidos, el segundo grupo de lechones recién nacidos que se usó para este experimento se alojó de forma independiente, y todo el personal que estuvo en contacto con los animales usó equipo de protección personal (EPP) en un intento por minimizar la exposición a patógenos. En el día 1 del experimento, se inyectaron 5 o 10 millones de células s.c. cerca de la base de la oreja derecha y en el flanco izquierdo del animal (cerdos bialélicos, n = 3; cerdos monoalélicos, n = 2). Un cerdo mutante bialélico murió por causa desconocida el día 7 sin mostrar ningún signo de formación de tumor, pero los otros dos desarrollaron tumores en cada uno de los dos sitios de inyección. La formación de tumores se produjo rápidamente en comparación con el lapso de tiempo habitual de muchas semanas en ratones SCID. Se observó un tumor palpable el día 12 debajo del sitio de la oreja de un cerdo mutante bialélico que había recibido una inyección de 10 millones de células (Fig. 14a y Fig. 13). El día 28, este tumor estaba encapsulado, era sólido y parcialmente quístico (tamaño, 3,4 x 2,5 cm; peso, 3,6 g) (Fig. 14 a y b), y parecía no haber provocado efectos secundarios en el hospedador. En la necropsia, se disecó en cinco trozos y se examinaron cortes de tejidos mediante tinción con HyE. Cada corte de tumor contenía una mezcla desorganizada de tejidos (Fig. 14c). El músculo estriado (mesodermo) (Fig. 14 c y e) era particularmente evidente y formaba islas de tejido distribuidas aleatoriamente por todo el tumor. Varias otras áreas comprendían células de tipo epitelio organizadas en estructuras de tipo glandular. Incluían epitelios secretorios: es decir, epitelio con células caliciformes (endodermo) (Fig. 14d) y epitelio neural (ectodermo) (Fig. 14f). Las evaluaciones histológicas generales se confirmaron mediante análisis inmunohistoquímicos con anticuerpos contra CTNNB1 y VWF [catenina y factor de von Willebrand (VWF, del inglés *von Willebrand factor*): endodermo] (Fig. 4 g y j), DES y ACTG2 (desmina y actina de músculo liso: mesodermo) (Fig. 4 h y k), y GFAP y ENO2 (del inglés, respectivamente, *glial fibrillary acidic protein* y *neuron-specific enolase*: proteína ácida fibrilar glial y enolasa específica de neuronas: ectodermo) (Fig. 4 i y l). También se observaron células positivas para los marcadores de linaje hematopoyético y células potencialmente pluripotentes (Fig. 17). El segundo cerdo mutante bialélico formó tumores de crecimiento más lento, más pequeños (0,75 g y 0,35 g) en el sitio de la oreja (donde se inyectaron 5 millones de células) y en el flanco (10 millones de células inyectadas) hacia las 7,5 semanas. Se encontró un tumor adicional en la cavidad peritoneal del segundo cerdo cerca del lugar de la inyección en el flanco izquierdo. Se observaron proporcionalmente menos tejido muscular y más estructuras quísticas (Fig. 15a) en los tumores del segundo cerdo, pero los derivados de las tres capas germinales todavía estaban presentes (Fig. 15 b-d). Estas diferencias en las características del teratoma no pueden atribuirse a la fuente de iPSC porque se usaron las mismas células para cada cerdo.

Los tumores también eran claramente de origen humano y no porcino, ya que los amplicones de MFN1 específica de

humanos (mitofusina mitocondrial 1) se amplificaron satisfactoriamente a partir del ADN de las iPSC humanas y su teratoma derivado, pero no del ADN del cerdo mutante (Fig. 16).

Para explorar si los cerdos *RAG24140, S141H/A140-527* podrían aceptar células de cerdo alogénicas, los inventores inyectaron lo que hemos infirieron previamente como células madre de trofoblasto porcino, que, en los ratones lampiños, habían dado lugar a tumores sólidos compuestos en gran parte de capas epiteliales empaquetadas, con islas de tejido muscular estriado cerca de la periferia. Estas mismas células proporcionaron un tumor encapsulado en los cerdos en cierta medida similar el día 17. Este tumor, como los de ratón, estaba compuesto predominantemente por capas de tejido epitelial.

Efectos ventajosos de la invención

Los cerdos que presentan el fenotipo de una inmunodeficiencia combinada grave (SCID) pueden ofrecer asistencia para una terapia con células madre, la investigación del cáncer y el desarrollo de injertos heterólogos. Los presentes inventores describen las producciones de dos tipos de cerdos SCID y genosuprimidos para *RAG2* a través de una modificación genética dirigida mediada por TALEN. La mutación monoalélica de *RAG2* provoca una deficiencia inmunológica verificada por la hipoplasia de la pulpa blanca, presentando un timo no detectado y la falta de linfocitos B y T.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra diagramas esquemáticos que ilustran la producción de cerdos SCID usando las TALEN, de los cuales (a) muestra la genosupresión mediada por TALEN de *RAG2*, (b) muestra un vector indicador donante que incluye un dominio de reconocimiento de TALEN, en que la escisión del dominio de reconocimiento de la TALEN en el vector indicador donante induce la expresión de GFP, (c) muestra la confirmación de las TALEN diseñadas *in vitro*, en que la expresión de la GFP puede detectarse solo cuando se transfectan TALEN junto con el gen indicador donante en una célula HEK 293T, y (d) muestra el genotipo de los cerdos modificados por ingeniería genética.

La Fig. 2 ilustra las características de los cerdos SCID que presentan síndrome de Omenn, de la que (a) muestra que no hay timo en el mutante bialélico de *RAG2*, (b) muestra los tamaños de los bazo de los cerdos de tipo silvestre, mutantes mono- y bialélicos, en que el mutante bialélico de *RAG2* tiene el bazo más pequeño en comparación con el tipo silvestre y el mutante monoalélico, (c) muestra los pesos de los bazo de los cerdos de tipo silvestre, mutantes mono- y bialélicos, en que el mutante bialélico de *RAG2* tiene un bazo más claro en comparación con otros, (d) muestra el fenotipo SCID en el cerdo mutante bialélico, en el que de acuerdo con la tinción de IHQ de CD79A (linfocito B) y CD3 (linfocito T) en el bazo, se puede confirmar que el mutante bialélico de *RAG2* tiene linfocitos B y T raros; los linfocitos B se observan alrededor del centro germinal en el tipo silvestre y el mutante monoalélico; y los linfocitos T se observan principalmente en la PALS; pero el número de linfocitos B o T en el mutante bialélico disminuye significativamente, y estas células no se observan en el grupo, y rara vez se observan como una célula individual en el estroma esplénico, (e) Resultado de citometrías de flujo que muestra una reducción significativa de linfocitos B (CD21) y T (CD3) en el bazo del mutante bialélico de *RAG2* en comparación con el cerdo de tipo silvestre. Solo el 2-3 % de los esplenocitos de los mutantes bialélicos fueron positivos para marcadores de linfocitos B o de linfocitos T, aproximadamente equivalente a la fluorescencia obtenida con un anticuerpo de control de isotipo y (f) peso corporal de los cerdos de control, mutantes monoalélicos y bialélicos. Los mutantes bialélicos de *RAG2* dejan de aumentar de peso después de dos semanas.

La Fig. 3 ilustra la construcción de un vector indicador sustituto para el enriquecimiento de las células objetivo mediante las TALEN. (a) El vector indicador consiste en el gen *RFP* monomérico, la secuencia diana de las nucleasas programables (medios sitios izquierdo y derecho), el *GFP* potenciador y el gen *H-2KK* (panel superior de a). Si las secuencia de *GFP* y *H-2KK* están fuera del marco debido a la ausencia de actividad de nucleasa programable, solo se expresa el gen *RFP*. Cuando las nucleasas programables introducen una rotura bicatenaria en la secuencia diana, la rotura se repara mediante unión de extremos no homólogos (UENH), lo que a menudo provoca mutaciones de cambio del marco. Dichas mutaciones pueden hacer que *GFP* esté en marco con *RFP*, induciendo la expresión de la proteína de fusión mRFP-eGFP-H-2KK (panel inferior de a), (b) El esquema ilustra el enriquecimiento de mutaciones inducidas por nucleasa en las células *mRFP+eGFP+H-2KK* separadas mediante dos sistemas: separación magnética mediante un anticuerpo para H-2KK y citometría de flujo mediante expresión de RFP y GFP. Dentro de las células, se ilustran plásmidos indicadores y los locus cromosómicos diana. Las mutaciones se muestran en la figura como puntos negros.

La Fig. 4 ilustra la separación por FACS de células positivas para GFP después de introducir las TALEN. (a) Hubo una alta coexpresión de RFP y GFP después de 48 horas postransfección, (b) Los cuadros debajo de las flechas indican células positivas para GFP. El 10 % de la parte superior de las células que expresan GFP fuerte se separaron y colocaron en placas de 96 pocillos. El intervalo de células positivas para GFP fue del 23,0 % al 38,0 % (barra de escala = 20 μ m).

La Fig. 5 ilustra la modificación mono y bialélica de *RAG2* utilizando TALEN. Se muestran los productos de PCR que flanquean el sitio de unión de la TALEN. En varias ocasiones, hubo una ausencia de banda de PCR en el tamaño de

tipo silvestre, lo que indica una clara modificación bialélica de *RAG2* (calle 14). Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2,0 %.

La Fig. 6 ilustra el análisis inespecificidad de los genes *RAG2* de los cerdos con *RAG2* mutado, (a) Parte superior) La digestión con nucleasa Surveyor de ADN heterodúplex no reveló mutaciones inespecíficas adicionales en los 7 locus con la homología más alta con el gen *RAG2*; MT: marcador de tamaño, calle 1: *MAN2A1*; 2: *FAM82A*; 3: *MTDH*; 4: *TRIM31*; 5: *PCSK2*; 6: *PRKACB*; 7, *GCFC2*. Parte inferior) Genes y homólogas de secuencia de la secuencia relacionada con *RAG2* para excluir mutaciones inespecíficas. Mayúscula: sitios de unión de la TALEN; minúscula; sitio de corte de la TALEN; pares de bases homólogas en rojo.

La Fig. 7 ilustra los resultados de la secuenciación por PCR para identificar colonias de células candidatas para la SCNT. La introducción de las TALEN induce polimorfismos cerca de los sitios de unión de la TALEN debido a UENH. Se analizaron los tipos de polimorfismos, luego se usaron colonias de células para la SCNT.

La Fig. 8 ilustra las imágenes de los modelos de cerdos SCID producidos de acuerdo con la presente invención, en que el acervo genético de los cerdos son los cerdos enanos de Minnesota.

La Fig. 9 ilustra la mutación en el dominio conservado de *RAG2*. (a) Secuencia proteica predicha de la mutación de *RAG2*. La delección de 14 pb da como resultado un codón de terminación prematura. (b) Secuencia proteica predicha de la mutación de *RAG2*. La pérdida de 3 pares de bases dio como resultado una delección y una falta de coincidencia de un aminoácido. (c) Los aminoácidos modificados están altamente conservados entre distintas especies. Esto sugiere que es probable que los mutantes tengan un *RAG2* no funcional.

La Fig. 10 ilustra defectos de desarrollo del bazo en los mutantes dobles de *RAG2*. Los cortes teñidos con HyE de mutantes bialélicos revelaron una marcada hipoplasia de la pulpa blanca con falta de centro germinal y de formación de vaina linfóide periarteriolar (PALS).

La Fig. 11 ilustra las imágenes de los mutantes bi- y monoalélicos de *RAG2* después de cuatro semanas. Los mutantes bialélicos de *RAG2* dejaron de aumentar de peso después de dos semanas. Después de cuatro semanas, hay una diferencia visible en el fenotipo entre los cerdos mutantes bi- y monoalélicos de *RAG2*.

La Fig. 12 ilustra la generación de iPSC humanas con plásmidos episómicos. (A) Imagen de contraste de fases de una colonia de iPSC 14 días después de las transfecciones de plásmido en la excrecencia del cordón umbilical. (B) Imagen de las colonias de iPSC aisladas en condiciones de cultivo sin alimentadores. (C-E) La proteína nuclear pluripotente POU5F1 (C), NANOG (D) y la molécula de superficie celular SSEA-4 (E) se expresaron en las células. Los paneles de la parte inferior muestran la tinción nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Barras = 200 μ m en A y B, y 100 μ m en E.

La Fig. 13 ilustra la progresión del crecimiento de teratomas en los cerdos mutantes para *RAG2*, (a) Los cerdos recibieron 10 millones de células. Se detectó un crecimiento en el lugar de la inyección alrededor de 12 a 14 días posinyección. (b) Los cerdos recibieron 5 millones de células. Se detectó un crecimiento después de 5 semanas posinyección. Las flechas indican sitios de posible crecimiento de teratoma. No se observó crecimiento en los mutantes monoalélicos de *RAG2*.

La Fig. 14 ilustra la formación de teratomas en cerdos *RAG24140*, *5141 H/4140-527*. (A) Vista exterior de un tumor en el día 16 (recuadro superior, flecha roja) y 4 semanas (inferior) después de la inyección de 10 millones de células debajo de la oreja. (B) Morfología macroscópica del tumor capsulado recogido del sitio de inyección. (C-0) Examen histológico de los tumores. Los cortes se tiñeron con HyE (C-F se recogieron del tumor en el sitio de la oreja) y para una gama de inmunohistoquímica de antígenos de diagnóstico (G-0). 0 se ve con un aumento menor de los tejidos. (Barra de escala: 200 [Lm) (M y N) Había células positivas para marcadores hematopoyéticos dentro del teratoma. (O) Presencia de células POU5F1+ indiferenciadas en el teratoma (fluorescencia verde, POU5F1; azul, tinción de DAPI para ADN). (Barra de escala: 200 μ m)

La Fig. 15 ilustra el análisis histológico del teratoma que se formó en el flanco lateral del segundo cerdo *RAG24140*, *S141H/A140-527*, donde la progresión del tumor fue relativamente lenta. El corte del tumor contenía una mezcla desorganizada de tejidos con proporcionalmente menos tejido muscular y más estructuras quísticas que las observadas en los teratomas del primer cerdo mutante (a) Vista a bajo aumento de un corte del teratoma; (b-d) cortes representativos que ilustran la presencia de las tres capas germinales (B endodermo; C mesodermo; D ectodermo) Barra = 100 [Lm.

La Fig. 16 ilustra el origen humano del teratoma. Se amplificó mediante PCR un fragmento de mitofusina mitocondrial 1 (*NMF1*) específica de ser humano. El tamaño esperado del amplicón de ser humano era de 236 pb. 1, ADN genómico de la línea de iPSC humana n.º 1; 2, ADN genómico de la línea de iPSC humana n.º 2; 3, ADN genómico del cerdo *RAG24140*, *S141H/4140-527* utilizado como receptor; 4, ADN genómico de los teratomas; (-), - control negativo (sin ADN).

La Fig. 17 ilustra la tinción utilizando marcadores hematopoyéticos. (a, b) Había células positivas para marcadores hematopoyéticos dentro del teratoma. (c) Presencia de células POU5F1+ indiferenciadas en el teratoma (fluorescencia verde, POU5F1; azul, tinción de DAPI para ADN).

5 Mejor modo de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes. No obstante, los siguientes Ejemplos son solo para ilustrar la presente invención, pero debe entenderse que el alcance de la presente invención no se limita a los siguientes Ejemplos.

10 Todos los animales y experimentos utilizados para la presente invención recibieron la aprobación del Comité de Ética Animal ubicado en la Universidad de Missouri.

Ejemplo 1: Transfección celular y modificación genética dirigida

15 Para la modificación genética dirigida, se transfectaron 2-3 millones de células con construcciones de TALEN con un vector indicador; 2 flg de cada construcción por millón de células. Las células se sometieron a electroporación con las construcciones a 490 V, 1 ms, 3 pulsos, utilizando un BTX Electro Cell Manipulator (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Las células se sembraron en placas en matraces T75 durante 48 horas, luego se separaron en cuanto a células
20 positivas para GFP utilizando Beckman Coulter MoFlo XDP. Las células separadas se sembraron en placas de 96 pocillos. Después de diez días, la mitad de las células se utilizaron para genotipado.

25 Para estudiar la presencia de indeles después de la introducción de las TALEN, se amplificó por PCR un fragmento de ADN genómico que flanquea el sitio de corte de la TALEN. El ADN genómico de las células cultivadas se aisló usando un tampón de lisis celular y luego se usó el ADN genómico para la PCR. Las condiciones de PCR para la amplificación fueron una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C seguida de 32 ciclos de 30 s a 94 °C para la desnaturalización, 30 s a 55 °C para la hibridación y 30 min a 72 °C para la extensión (véanse los juegos de cebadores de PCR enumerados en la Tabla 1). Los tamaños esperados de los productos de PCR fueron de 417 pb para *IL2RG* y de 426 pb para *RAG2*. Los productos de PCR se secuenciaron para identificar la presencia de indeles.

Ejemplo 2: Trasplante nuclear de células somáticas

35 Para producir embriones con SCNT, se adquirieron ovocitos obtenidos de cerdas de ART (Madison, WI). Los ovocitos se enviaron durante la noche en medio de maduración (TCM199 con Hepes 2,9 mM, insulina 5 µg/ml, EGF 10 ng/ml, 0.5 [tg/mlp-FSH, piruvato 0,91 mM, cisteína 0,5 mM, líquido folicular porcino al 10 %, gentamicina 25 ng/ml) y se transfirieron a medio recién preparado después de 24 horas.

40 Después de 40-42 horas de maduración, se retiraron las células del cúmulo de los ovocitos agitando en agitadora vortical en presencia de hialuronidasa al 0,1 %. Durante la manipulación, los ovocitos se colocaron en el medio de manipulación complementado con citocalasina B 7,0 µg/ml. El cuerpo polar junto con una porción del citoplasma adyacente, conteniendo presumiblemente la placa de metafase II, se retiró y se colocó una célula donante en el espacio perivitelino usando un capilar de vidrio fino. A continuación, los embriones reconstruidos se fusionaron en un medio de fusión (manitol 0,3 M, CaCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 0,1 mM, Hepes 0,5 mM) mediante dos pulsos de CC (intervalo de 1 s) a 1,2 kV/cm durante 30 s usando un BTX Electro Cell Manipulator (Harvard Apparatus). Después de la fusión,
45 los embriones fusionados se activaron completamente con timerosal 200 [iM durante 10 min en la oscuridad y ditiotreitól 8 mM durante 30 min. Luego, los embriones se incubaron en medio Porcine Zygote 3 (PZM3)³ con scriptaid 0,5 µM, un inhibidor de la histona desacetilasa, durante 14-16 horas. Al día siguiente, los embriones de SCNT se transfirieron a sustitutas. Para las transferencias de blastocistos, los embriones se lavaron del scriptaid y se cultivaron durante cinco días más en PZM3 en presencia de CSF 10 ng/ml. Los embriones de SCNT se transfirieron
50 quirúrgicamente a la unión ampular-ístmica de una sustituta.

Ejemplo 3: Inmunohistoquímica (IHQ)

55 Para la IHQ, se utilizaron tejidos fijados en tampón neutro con formalina al 10 %. Los tejidos se incluyeron en portaobjetos para IHQ. En primer lugar, se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena en peroxidasa de hidrógeno al 3 %. Las muestras se trataron previamente con Borg Decloaker y luego se bloquearon en una solución Sniper de fondo. Después del lavado, las muestras se incubaron con anticuerpos primarios específicos para linfocitos B (CD79A; Diagnostic Biosystems- n.º M0b1l8, 1:100) o linfocitos T (CD3; DAKO- n.º A0452, 1:400). Después de la incubación, las muestras se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP. A continuación, las muestras se
60 tiñeron con cromógenos rojo Romulin para visualizar la señal. Las muestras también se tiñeron con IP FLX hematoxilina para proporcionar fondos. Borg, Sniper, Rojo Romulin y IP FLX hematoxilina se adquirieron todos de Biocare (Concord, CA). Todas las fotomicrografías se adquirieron usando un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara de microscopio digital de alta resolución Olympus DP70 (Olympus, Center Valley, PA).

Ejemplo 4: Citometría de flujo

Se recogieron porciones del bazo de lechones de tipo silvestre y bialélicos recién sacrificados en medio RPMI-1640 (Mediatech, Inc., Manassas, VA) complementado con suero fetal bovino al 10 %, se trituraron con una hoja de bisturí, se aspiraron varias veces a través de una aguja de calibre 20, y luego se forzó a través de un colador celular de malla de nailon de 70 m (BD Biosciences, San José, CA). A continuación, la suspensión de esplenocitos se incubó durante 15 minutos con solución Pharm Lyse (BD Biosciences) para lisar los eritrocitos y luego se sedimentó a 200 x g durante cinco minutos. Tras descartar sobrenadante, el sedimento se resuspendió en tampón de tinción frío (BD Pharmingen) y las células se contaron en un hemocitómetro. A continuación, las células se dividieron en alícuotas de 5×10^6 células en 200 µl de tampón de tinción. Se añadieron anti-CD21 de cerdo en ratón unido a FITC, anti-CD 3E de cerdo en ratón e IgG 1k anti-micotoxina T-2 en ratón (grupo de control de isotipo) (SouthernBiotech, Birmingham, AL) se añadieron a las células a 0,5 µg/1 x 10^6 células y a continuación, se cultivó a 4 °C en condiciones de oscuridad. A continuación, se lavaron dos veces las células y se resuspendieron en tampón de tinción recién preparado. Las células se analizaron en la University of Missouri Cell and Immunobiology Core Facility utilizando un citómetro de flujo CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, CA). Los datos se analizaron utilizando el programa informático Summit v4.3 (Beckman Coulter).

Ejemplo 5: Análisis de inespecificidad

Para identificar supuestas secuencias inespecíficas de las TALEN utilizadas en la presente invención, se utilizaron herramientas bioinformáticas para identificar secuencias similares a cada sitio de unión de la TALEN a partir del ensamblaje del genoma porcino más reciente (Sscrofa10.2). Los cebadores de PCR se diseñaron flanqueando los sitios diana más probables basándose en el número de diferencias de nucleótidos. Estas regiones se amplificaron en los animales fundadores y se analizaron en cuanto a sucesos inespecíficos utilizando el ensayo de nucleasa Surveyor (Tablas 2 y 3). Después de la amplificación por PCR, se transfirieron de 300 a 500 ng de los productos de PCR (10 a 15 µl) a un tubo nuevo y a continuación, se desnaturalizaron e hibridaron de acuerdo con un programa de termociclador (95 °C durante 2 min, 95 °C a 85 °C -2 °C por segundo, 85 °C a 25 °C -0,1 °C por segundo, 4 °C indefinidamente). se le añadieron 1 µl de la nucleasa Surveyor y 1 µl de potenciador de Surveyor, y luego, se incubó a 42 °C durante 30 minutos. A continuación, las reacciones se colocaron inmediatamente en hielo y se añadieron a las reacciones tampón de detención de nucleasa Surveyor 6X y colorante 6X. Las muestras se sometieron a electroporación en un gel de agarosa al 2,0 %.

Ejemplo 6: Ensayo de TUNEL

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4 % (p/v) en PBS 0,01 M (pH 7,4), se lavaron en PBS, se deshidrataron en etanol (70 %, 90 % y 100 %) y se incluyeron en cera de parafina. Los cortes (6 µm) se rehidrataron (xileno 5 min; etanol al 100 %, 95 %, 70 %, 2 min cada uno) y se lavaron en agua destilada antes de la tinción de TUNEL (del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*, marcaje de extremo final por mella con dUTP por desoxinucleotidil transferasa terminal). Los cortes se incubaron durante 30 min con proteinasa K (20 g/ml en Tris/HCl 10 mM, pH 7,5) a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda con la mezcla de TUNEL (kit In situ Cell Death Detection, Roche, Suiza). Después de tres lavados con PBS, los portaobjetos se montaron en medios de montaje VECTASHIELD con DAPI (VECTOR, EE. UU.).

Ejemplo 7: Ensayo de proliferación celular

Se midió la proliferación celular de fibroblastos obtenidos de los cerdos de tipo silvestre, RAG2 monoalélico y RAG2 bialélicos contando el número de células en cultivo después de 24 h y 48 h. Las células se sembraron a 1×10^4 células/pocillo en placas de 12 pocillos recubiertas con laminina. Se contó el número de células en cada pocillo a las 0, 24 y 48 h. Las células se tiñeron con colorante azul tripano al 0,4 % (Bio-Rad) para verificar su viabilidad. El número de células en cada punto de tiempo se midió utilizando el contador de células automatizado TC10 (Bio-Rad); se utilizaron tres muestras independientes de cada cerdo. Las diferencias en el número de células a las 24 y 48 h se compararon utilizando el sistema Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC).

Ejemplo 8: Obtención de fibroblastos de cordón umbilical humano

Se recogieron tejidos del cordón umbilical humano recientes y en condiciones asépticas en el Hospital Universitario (Universidad de Misuri, Columbia, MO). La recolección de tejido (proyecto n.º 1201132) ha sido aprobada por la University of Missouri Health Sciences Institutional Review Board. Los tejidos se lavaron dos veces o más con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar los glóbulos sanguíneos y se trituraron con tijeras en fragmentos de 1-2 mm³ en medio DMEM para suministrar células adherentes mediante el método de explantes. Los tejidos fragmentados se colocaron en una placa de 48 pocillos (un trozo por pocillo) recubierta con gelatina al 0,1 % en medio DMEM (Thermo) que contenía FBS al 10 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM y FGF2 4 ng/ml, seguido de cultivo en una incubadora con atmósfera humidificada de O₂/ al 4 %/CO₂ al 5 %/N₂ al 91 % a 37 °C. Los cultivos se mantuvieron en reposo durante los primeros 5-7 días y se complementaron con Primocin (InvivoGen, San Diego, CA) para reducir el riesgo de crecimiento de bacterias y hongos en el cultivo primario. El medio sin Primocin u otros antibióticos se renovó cada dos días a partir de entonces hasta que las células adherentes fibroblásticas de los fragmentos de tejido desarrollaron focos de crecimiento en los pocillos. Las zonas de crecimiento de fibroblastos comenzaron a aparecer en la periferia de los tejidos triturados después de una semana de

cultivo. Hacia los 10-11 días, los fibroblastos se pasaron desde la placa de 48 pocillos a matraces T25 utilizando TrypL E (Invitrogen). Las células alcanzaron la confluencia en el matraz hacia los —14 días y se expandieron para reprogramarlas a iPSC.

5 Ejemplo 9: Generación de las iPSC a partir de fibroblastos de cordón umbilical con vectores episómicos

Para reprogramar los fibroblastos se empleó un protocolo desarrollado por Okita *et al* con vectores episómico portando ARNhc para la supresión de p53 y L-MYC no transformante, además de los genes de reprogramación habituales *POU5F1*, *SOX2*, *KLF4* y *LIN-28*. Se sometieron a electroporación tres microgramos de la combinación Y4 de los
10 plásmidos episómicos en 6×10^5 células con un dispositivo Nucleofector II (Lonza, Basilea, Suiza) y el kit Amaxa NHDF Nucleofector (Lonza), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó en el dispositivo un programa de electroporación 'U-020'. Se permitió que las células se recuperaran durante 2 a 4 días cultivándolas en las condiciones anteriores. Se colocaron las células (2×10^5) en placas de 100 mm previamente recubiertas con Matrigel (BD Bioscience, San José, CA). Al día siguiente se cambió el medio de cultivo a mTeSR1 (StemCell Technologies,
15 Vancouver, Canadá). Las colonias que se asemejan a CME humanas surgieron alrededor de 14 días posttransducción y las colonias se aislaron mecánicamente alrededor del día 20, y se expandieron a una condición sin alimentador sobre un sustrato de Matrigel.

20 Ejemplo 10: Examen inmunohistoquímico de iPSC

Se capturaron imágenes de iPSC con un microscopio invertido Olympus CKX41 equipado con una cámara digital Coolpix 5000 (Nikon, Melville, NY). Para el análisis inmunofluorescente, las células se cultivaron en cubreobjetos recubiertos con Matrigel. Después de la fijación en paraformaldehído al 4 %/PBS durante 10 min y la permeabilización en Triton X100 al 1,0 %/PBS durante 30 min, los cubreobjetos se colocaron en suero de cabra al 5 %/BSA al 5 % en
25 PBS durante 1 h. A continuación, las células se incubaron durante una noche a 4 °C con anticuerpos primarios adecuadamente diluidos, *POU5F1* (1:200, sc-5279, Santa Cruz Biotechnology), *NANOG* (1:100, ac 109250, Abcam) y *SSEA4* (1:100, n.º 4755p, Cell Signaling Technology) y seguido de incubación con anticuerpo de cabra o de conejo anti-ratón marcado con Alexa Fluor 568 o 488 (1:500). Las imágenes se capturaron con un microscopio invertido Olympus 1X70 equipado con una cámara CCD ORCA-AG (<http://www.biotech.missouri.edu/mcc/Olympus.html>).

30 Ejemplo 11: Formación de teratomas

Se inyectaron dos líneas de iPSC humanas (números de pase entre 4 y 9) de dos individuos (5 o 10 millones de células por sitio) en un volumen de 0,2 ml con una solución de Matrigel al 25 % por vía subcutánea en cinco cerdos, 3 de ellos
35 con una modificación bialélica de *RAG2* y 2 con modificación monoalélica de *RAG2* como control, el día 1. Las iPSC cultivadas se despegaron mediante dispasa (StemCell Technologies) y raspado. Después de una centrifugación (200 x g, 5 min), el sedimento celular se resuspendió con 0,1 ml de medio mTeSR1 y se mezcló con el mismo volumen de Matrigel al 50 %. A continuación, las células se enfriaron en hielo y se cargaron en una jeringuilla de 1 ml (BD, Franklin Lakes, NJ), y se inyectaron en dos sitios por cerdo, una oreja y un flanco lateral, a través de agujas de calibre 22. Los
40 tumores posteriores se disecaron y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % (v/v). El tejido incluido en parafina se cortó y luego se tiñó con hematoxilina y eosina (HyE). Se trasplantaron células porcinas que expresaban fenotipos de trofoblasto generadas a partir de iPSC porcina (iTR) se trasplantaron a uno de los cerdos mutantes de *RAG2* bialélicos. Se desprendieron diez millones de células de la línea del subtipo iTR (p29) mediante TrypLE y raspado. La suspensión celular se preparó como iPSC humana y se inyectó por vía subcutánea en la oreja izquierda. Los
45 procedimientos de trasplante de células se realizaron en un formato con enmascaramiento, desconociendo el individuo que realiza los procedimientos el estado genético de los cerdos.

Ejemplo 12: Análisis inmunohistoquímico de los teratomas

Para la inmunohistoquímica (IHQ), los tejidos se fijaron en formalina al 10 % en tampón neutro (Fisher, 99-909-14), se incluyeron en parafina y los cortes (5 µm) se prepararon sobre portaobjetos de vidrio. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó primero tratando los cortes de tejido con peroxidasa de hidrógeno al 3 % durante una hora. A continuación, las muestras se pretrataron con solución Borg Decloaker (Biocare Medical, CA) para la recuperación de
50 antígenos y luego se bloquearon en solución Sniper de fondo (Biocare Medical, CA). Después del lavado, las muestras se incubaron con anticuerpos primarios (Tabla 4). Después de incubar, las muestras se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Para la detección se empleó el sistema EnVisionTM+ (Dako, Carpintería, CA). Para visualizar la señal, se utilizó 3,3-diaminobencidina (DAB) o el cromógeno rRomulin AEC (Biocare Medical, Concord, CA). Las muestras también se tiñeron con IP FLX hematoxilina para proporcionar un fondo. Todas las fotomicrografías se adquirieron utilizando un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss,
60 Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara de microscopio digital de alta resolución Olympus DP70 (Olympus, Center Valley, PA). Borg, Sniper, Rojo Romulin y IP FLX hematoxilina se adquirieron todos de Biocare (Concord, CA).

Ejemplo 13: Origen del teratoma

65 Para identificar el origen de los teratomas, se amplificó mediante PCR el gen de la mitofusina 1 (*MFN1*) mitocondrial, específico de ser humano. Se aisló ADN genómico de iPSC humanas, de los teratomas y de sangre de la cola del

cerdo mutante para *RAG2* portador de teratoma utilizando un kit DN easy Blood and Tissue (Qiagen, EE. UU.). Las condiciones para la amplificación por PCR fueron una desnaturalización inicial de 2 min a 96 °C seguida de 32 ciclos de 30 s a 95 °C para la desnaturalización, 30 segundos a 52 °C para la hibridación y 30 minutos a 72 °C para la extensión. Los productos de la PCR se cargaron en gel de agarosa al 2,5 %. El tamaño esperado de los productos de PCR fue de 236 pb. Los cebadores para el análisis fueron D: GCTGGCTAAGAAGGCGATTA (SEQ ID NO: 2) e I: TCCCCTTCTGGAGGTTAGAAA (SEQ ID NO: 3).

Tabla 1

[Tabla 1]		
GEN	Cebador	producto
RAG2	D: AAGGATTCCTGCTACCTTCCTCCT (SEQ ID NO: 4) I: AGATAGCC-CATCTTGAAGTTCTGG (SEQ ID NO: 5)	426

La Tabla 1 muestra los cebadores utilizados para los mutantes de genotipo *RAG2* inducidos mediante las TALEN.

Tabla 2

[Tabla 2]			
Gen	Abreviatura	Cebador	Producto
Manosidasa 2, alfa 1	<i>MAN2A</i>	D: TGCCACATGATGCCTTTCTA (SEQ ID NO: 6) I: TGCTGGTTCAAGATGCTGTC (SEQ ID NO: 7)	205
Familia con similitud de secuencia 82, miembro A2	<i>FAM82A</i>	D: CCTAGGCCTGAGTGTGGGTA (SEQ ID NO: 8) I: GCCCT-GACGCTTTTATTCTG (SEQ ID NO: 9)	194
Metadherina	<i>MTDH</i>	D: TCCTTGCTTCCTTGACTGT (SEQ ID NO: 10) I: CGAGAG-CATTTCTCGTAGCC (SEQ ID NO: 11)	155
Motivo tripartito que contiene 31	<i>TRIM31</i>	D: TGTGCAGTTTTCAACCATCC (SEQ ID NO: 12) I: GTCTTTCAGTCC-CCCTTTCC (SEQ ID NO: 13)	163
Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 2	<i>PCSK2</i>	D: ACAAGTGGCCTTTCATGACC (SEQ ID NO: 14) I: CTCTTC-CTCCAGCTCCTCCT (SEQ ID NO: 15)	218
Proteína cinasa, dependiente de cAMP, catalítica, beta	<i>PRKACB</i>	D: CACTAAATAGTGGC-CTTCTTGGA (SEQ ID NO: 16) I: ACA-CACCCATCCTTTTCCAG (SEQ ID NO: 17)	352

(continuación)

Gen	Abreviatura	Cebador	Producto
Factor de unión a ADN de secuencia rica en GC 2	GCFC2	D: GAAATGGGTTTGTGAGTCCA(SEQ ID NO: 18) I: ACGGTGGCA-GAGCTGAATAG(SEQ ID NO: 19)	417

La Tabla 2 muestra el juego de cebadores utilizados para identificar el direccionamiento inespecífico de cerdos RAG2.

5 Tabla 3

[Tabla 3]

Tipos celulares	Número de embriones producidos (transferidos)	Lechones nacidos vivos (nacidos muertos)
RAG2 n.º 14 (o)	248 (243)	6(2)
RAG2 n.º 14 (e)	180 (180)	3(1)
RAG2 n.º 12, 14 (o)	95 (48)	6
RAG2 n.º 32 (y)	259 (249)	Gestante de 96 días
RAG2 n.º 32 (y)	262 (252)	Gestante de 95 días
RAG2 n.º 32 (y)	260 (250)	Gestante de 89 días

La Tabla 3 muestra las eficacias de los trasplantes nucleares de acuerdo con la presente invención.

10

Tabla 4

[Tabla 4]

Antígeno objetivo	Fuente	Dilución
CD79A	Diagnostic Biosystems-n.º Mob118	1:100
CD3	DAKO-n.º A0452	1:400
CD335	Bioss-n.º bs-2417R	1:100
CD34	Leica -n.º PA0212	Prediluido
CD45	Leica -n.º PA0042	Prediluido
GFAP	Leica -n.º PA0026	Prediluido
ENO2	Leica-n.º PA0435	Prediluido
CTNNB 1	Leica-n.º PA0083	Prediluido
VWF	DAKO-n.º A0082	1:100
ACTG2	Leica-n.º PA0943	Prediluido
DES	Leica-n.º PA0032	Prediluido
CD 204	Transgenic Inc -n.º KT022	1:100

15 La Tabla 4 son los anticuerpos utilizados para IHQ.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir cerdos enanos de tipo con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) que tienen una mutación bialélica del gen activador de la recombinación (RAG) 2, comprendiendo el método: inducir una mutación bialélica dirigiendo una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) a una región de secuencia de reconocimiento de TALEN como se expone en la SEQ ID NO: 1 en el cromosoma 2 de un cerdo (*Sus scrofa*); y producir embriones mutantes utilizando las células con la mutación bialélica inducida para el trasplante nuclear de células somáticas (SCNT).
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método se realiza mediante la transfección de las células de interés utilizando un vector que codifica una nucleasa de ADN efectora de TAL.
3. Un cerdo enano de tipo SCID que tiene una mutación bialélica del gen activador de la recombinación (RAG) 2 producida por el método de la reivindicación 1.
4. Una célula de cerdo que tiene una mutación bialélica del gen activador de la recombinación (RAG) 2, en donde la mutación bialélica se induce dirigiendo una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) a una región de secuencia de reconocimiento de TALEN como se expone en la SEQ ID NO: 1 en el cromosoma 2 de un cerdo (*Sus scrofa*).

[Fig. 1a]

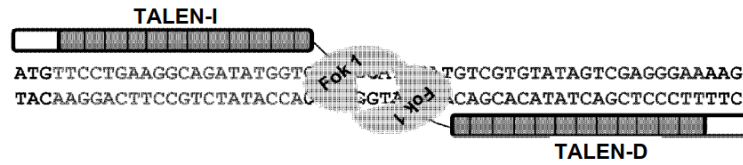


FIG. 1A

[Fig. 1b]



FIG. 1B

[Fig. 1c]

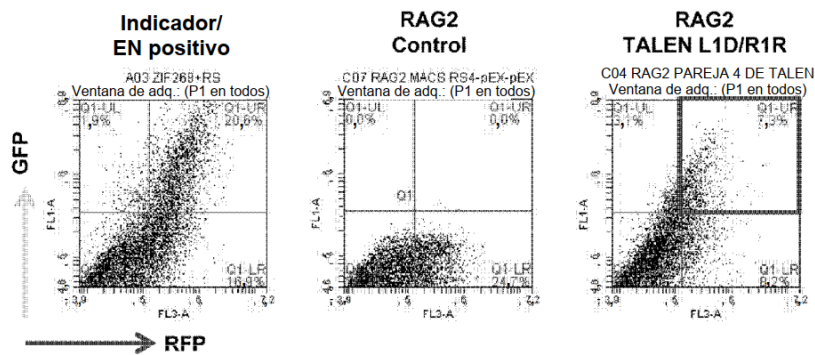


FIG. 1C

[Fig. 1d]

RAG2 monoalélico

TTCCTGAAGGCAGATATGGTCATTCCATTGATGTCGTGTATAGTCGAGGGAA

TTCCTGAAGGCAGATATGGTC ---- CCATTGATGTCGTGTATAGTCGAGGGAA

RAG2 dialélico

TTCCTGAAGGCAGATATGGTC ---- CCATTGATGTCGTGTATAGTCGAGGGAA

TTCCTGAAGGCAGATATG-----GTCGTGTATAGTCGAGGGAA

FIG. 1D

[Fig. 2a]

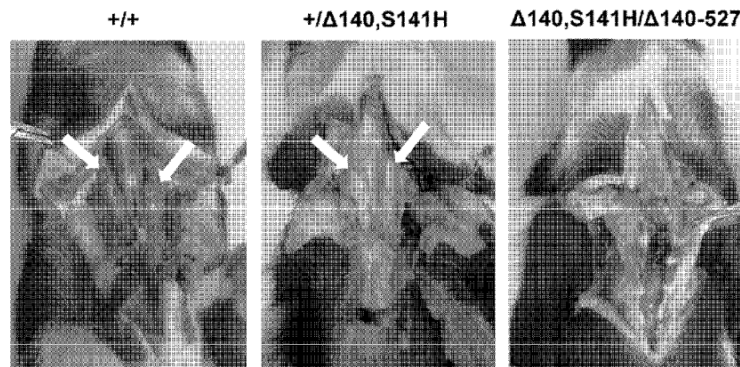


FIG. 2A

[Fig. 2b]

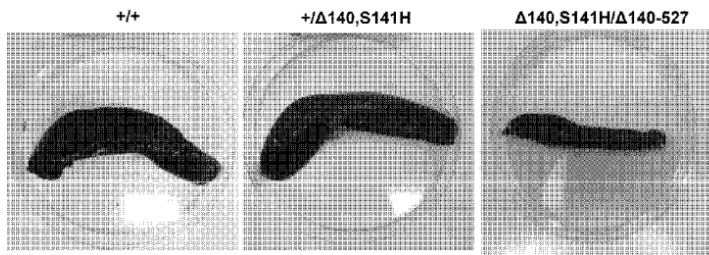


FIG. 2B

[Fig. 2c]

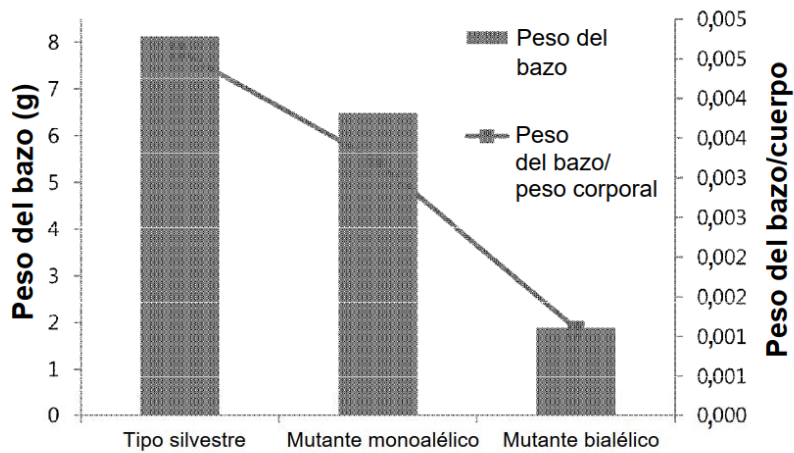


FIG. 2C

[Fig. 2d]

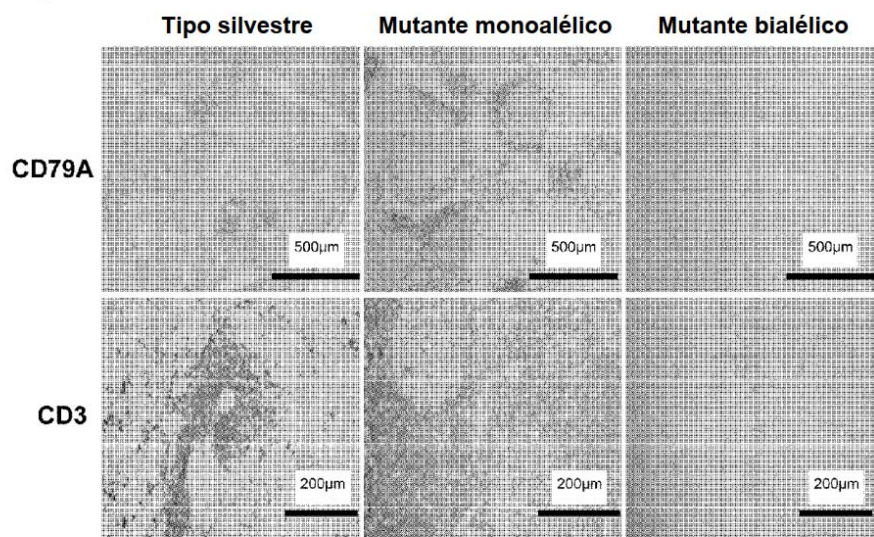


FIG. 2D

[Fig. 2e]

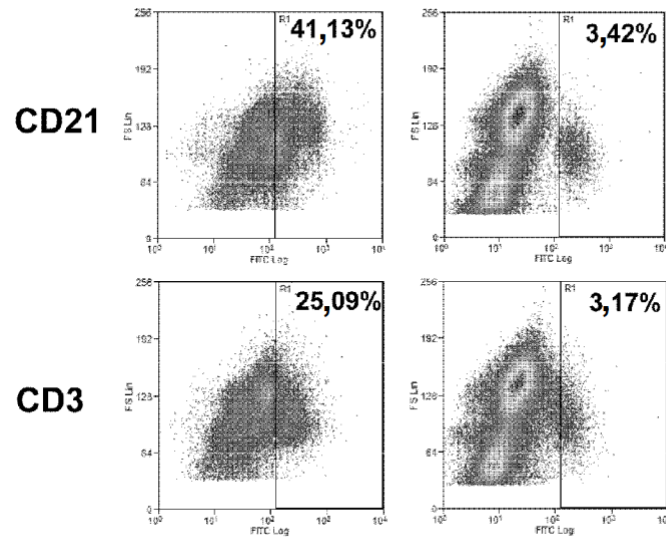


FIG. 2E

[Fig. 2f]

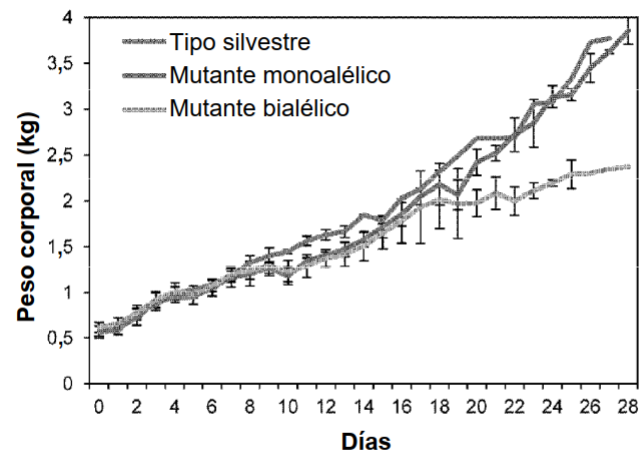


FIG. 2F

[Fig. 3]

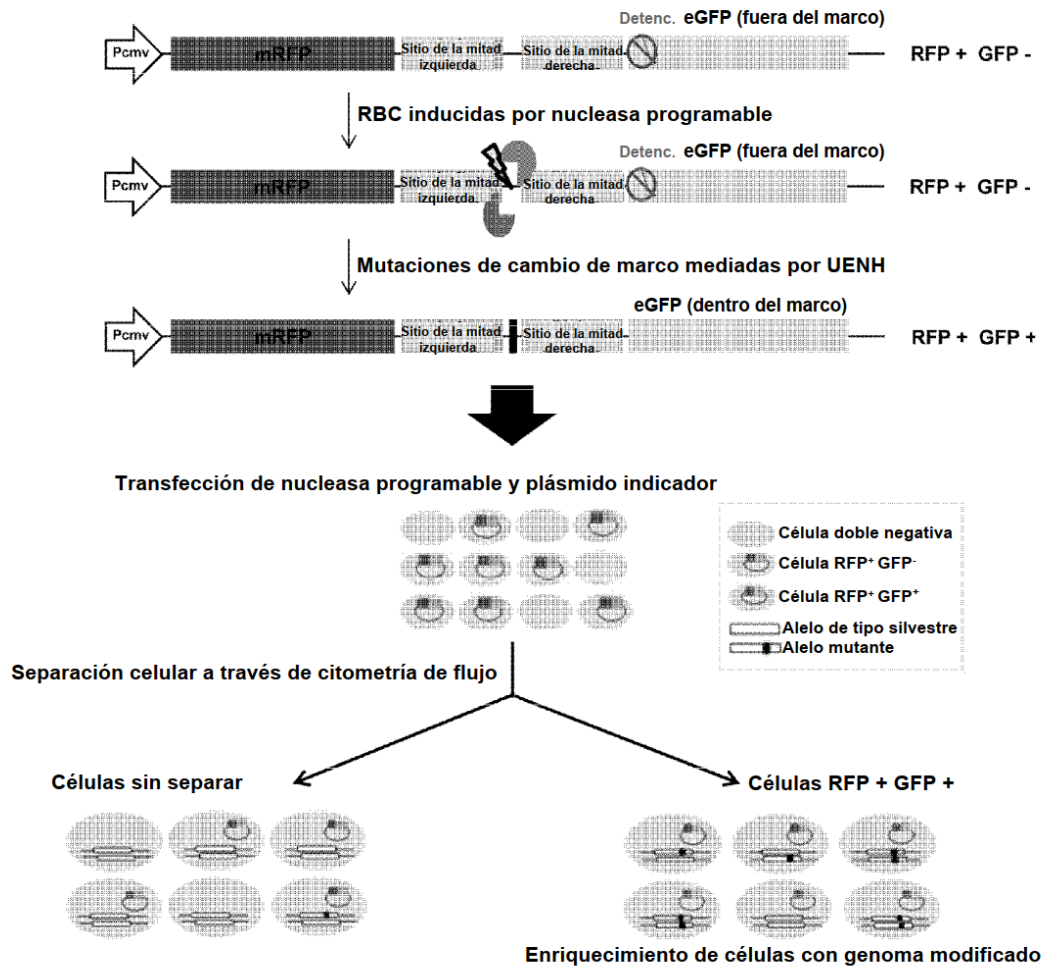


FIG. 3

[Fig. 4a]

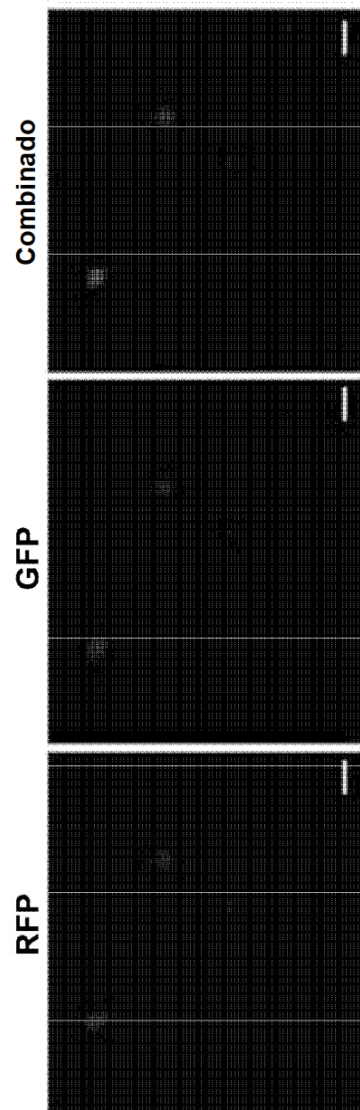


FIG. 4A

[Fig. 4b]

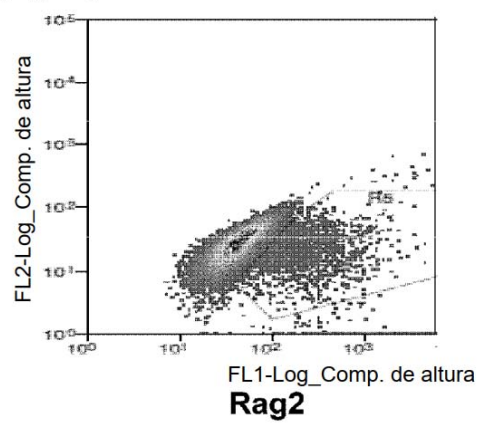


FIG. 4B

[Fig. 5]

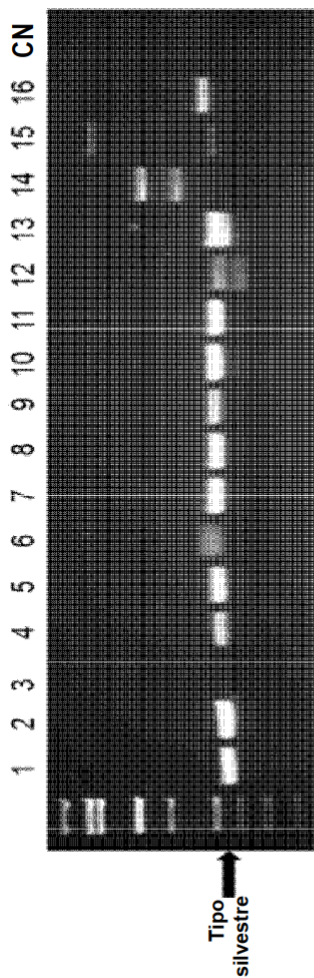


FIG. 5

[Fig. 6]

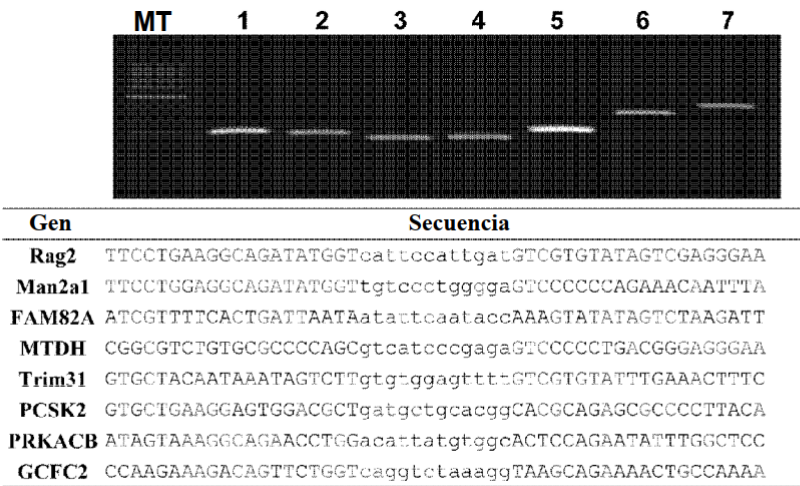


FIG. 6

[Fig. 7]

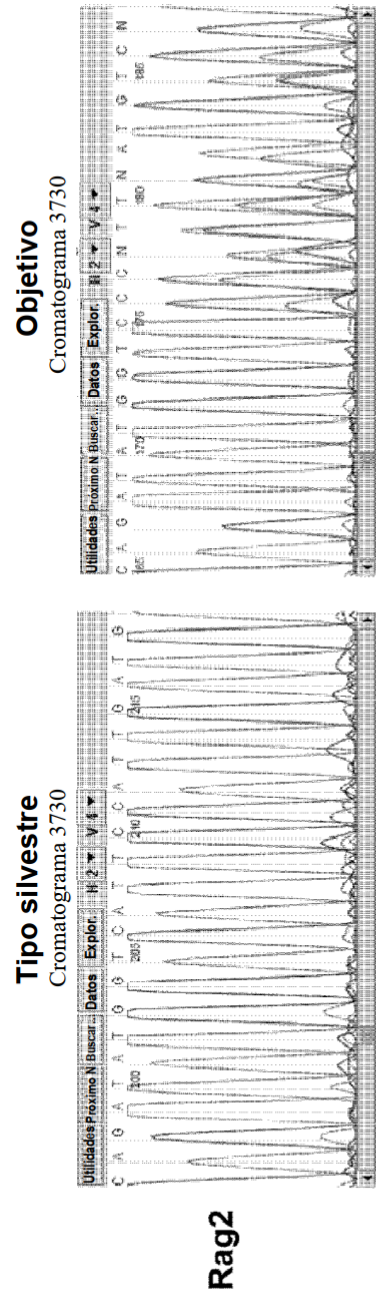
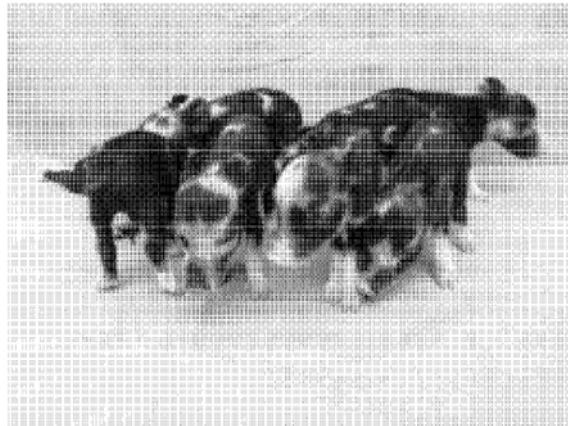


FIG. 7

[Fig. 8]



RAG2

FIG. 8

[Fig. 9]

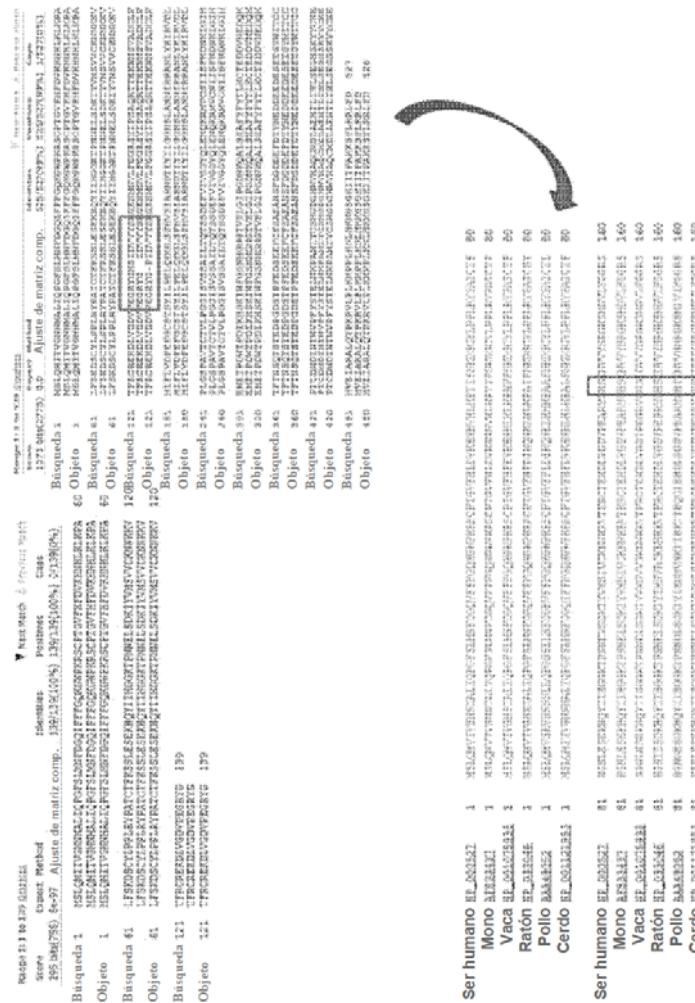


FIG. 9

[Fig. 10]

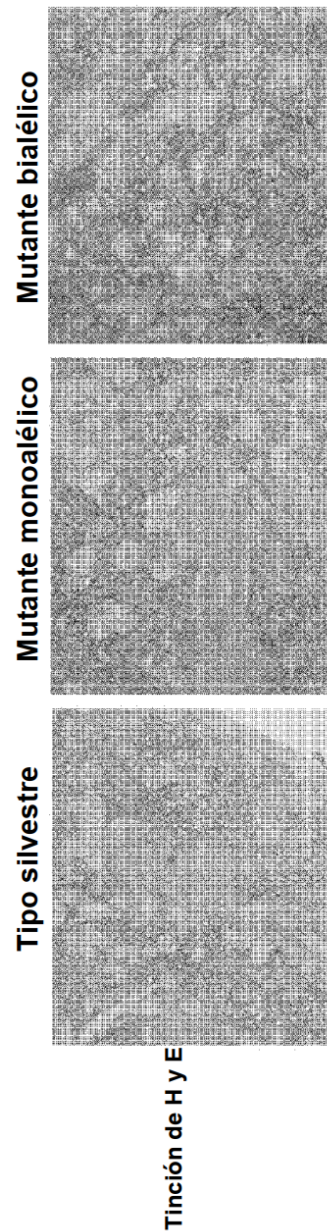


FIG. 10

[Fig. 11]

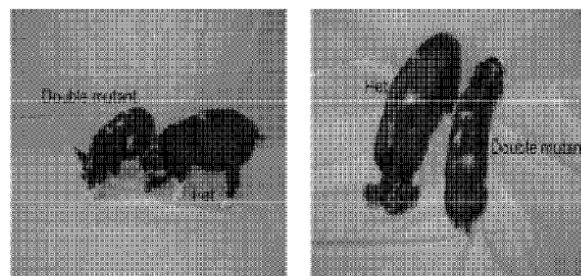


FIG. 11

[Fig. 12]

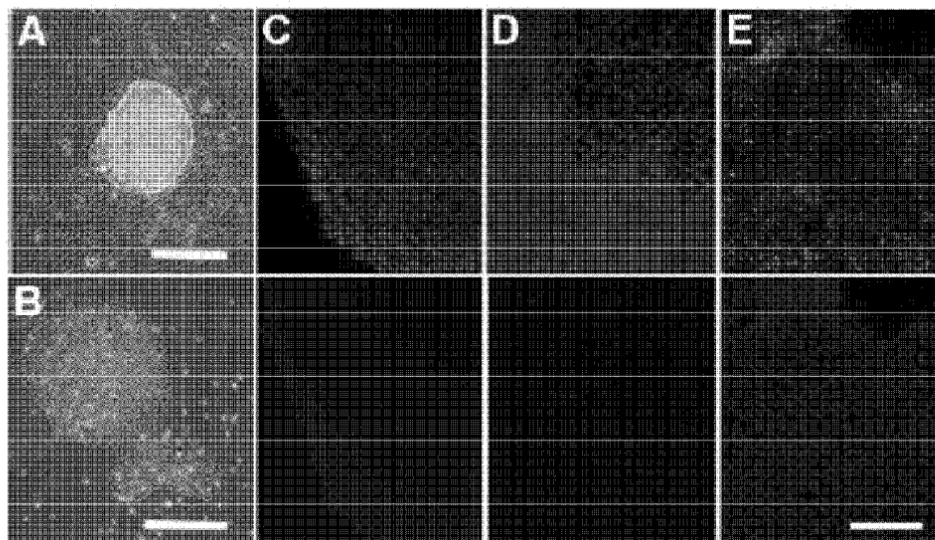


FIG. 12

[Fig. 13]

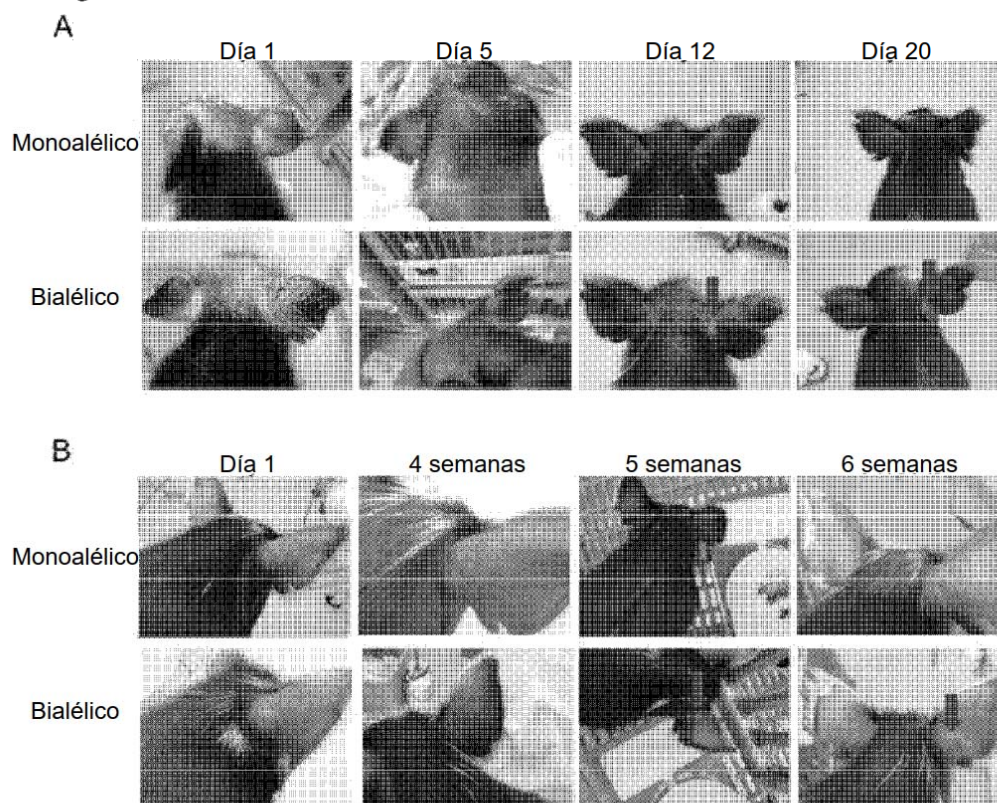


FIG. 13

[Fig. 14]

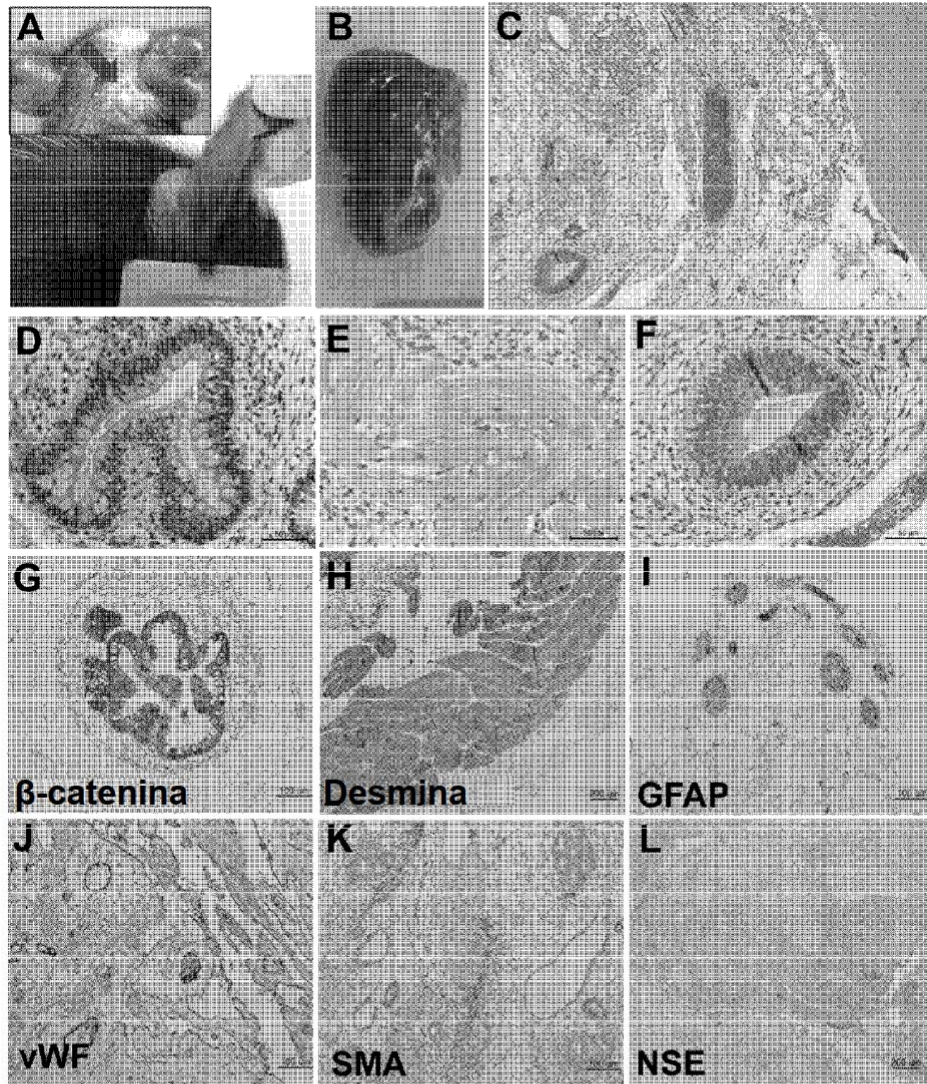


FIG. 14

[Fig. 15]

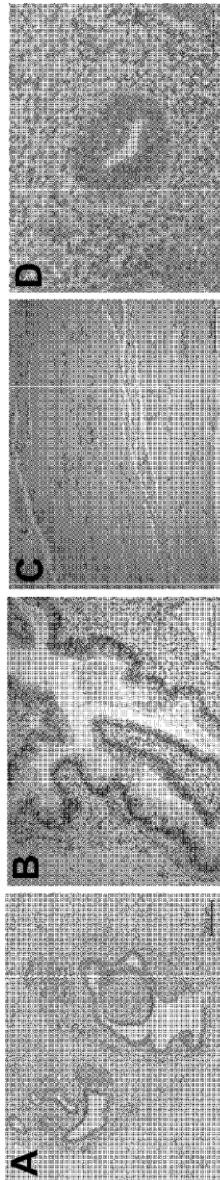


FIG. 15

[Fig. 16]

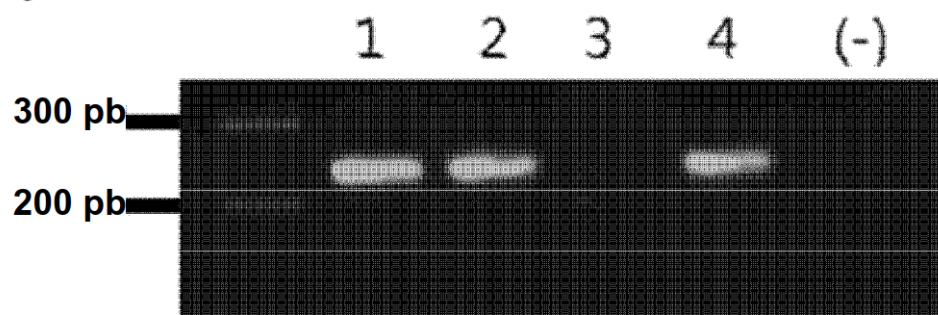


FIG. 16

[Fig. 17]

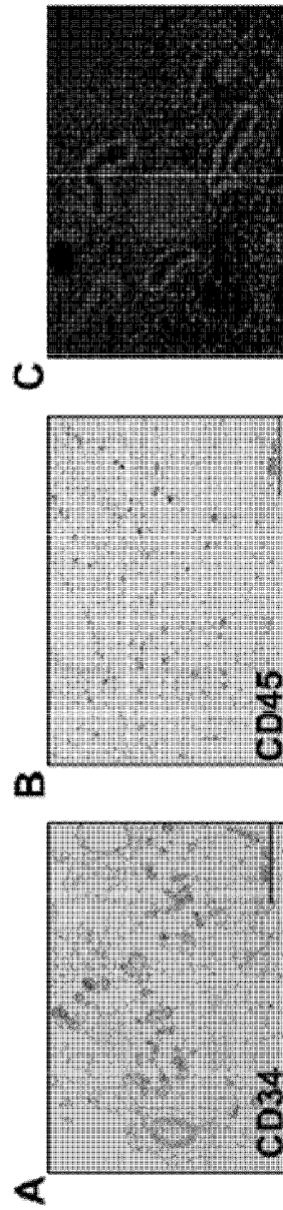


FIG. 17