

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) **61041 B1**
6(51) C 12 N 15/87



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 94777
(22) Заявено на 08.07.91
(24) Начало на действие
на патента от: 08.01.90

Приоритетни данни

(31) 19050 (32) 10.01.89 (33) IT

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 10А на 24.12.93
(45) Отпечатано на 30.12.96
(46) Публикувано в бюлетин № 9
на 30.09.96
(56) Информационни източници:
US 4736866
WO87/05325

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):
Consiglio Nazionale Delle Ricerche
Roma (IT)

(72) Изобретател(и):
Corrado Spadafora, Roma (IT)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Лиляна Борисова Цачева
1113 София, жк "Изток" бл.49

(86) № и дата на РСТ заявка:
РСТ/EP90/00032, 08.01.90

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO90/08192, 26.07.90

**(54) МЕТОД ЗА ПРОИЗВЕЖДАНЕ НА НЕЧОВЕШКИ ТРАНСГЕНЕТИЧНИ ЖИВОТНИ ЧРЕЗ
ВЪВЕЖДАНЕ НА ЕКЗОГЕННА ДНК В СОМАТИЧНИ И ЗАРОДИШНИ КЛЕТКИ НА ЖИ-
ВОТНИТЕ**

(57) Методът е приложен в генното инженерство и биотехнологията. С него се създава възможност за изучаване генната регулация за химични и терапевтични цели и при развъждането на животни. Създават се трансгенетични животни, при които трайно е интегрирана информация, произхождаща от друга генетична система, чужда за генома на индивида. По метода екзогенна ДНК се вкарва в соматични и зародишни клетки, като предварително се модифицира по известните техники за рекомбинантни ДНК, след което се вкарва в сперматозоидите на животните, които ще се модифицират и вследствие на това яйцеклетките се оплождат.

6 претенции

BG 61041 B1

(54) МЕТОД ЗА ПРОИЗВЕЖДАНЕ НА НЕЧОВЕШКИ ТРАНСГЕНЕТИЧНИ ЖИВОТНИ ЧРЕЗ ВЪВЕЖДАНЕ НА ЕКЗОГЕННА ДНК В СОМАТИЧНИ И ЗАРОДИШНИ КЛЕТКИ НА ЖИВОТНИТЕ

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение се отнася до метод за произвеждане на нечовешки трансгенетични животни чрез въвеждане на екзогенна ДНК в соматични и зародишни клетки на животни.

По-специално, методът се състои във въвеждане на ДНК, екзогенна или модифицирана, съгласно познатите техники за рекомбинантна ДНК, в главата на сперматозоида на животното, което трябва да бъде модифицирано, и в използване на модифицирания сперматозоид за оплождане на яйцеклетка в съответствие с известните техники за изкуствено осеменяване.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Създаването на трансгенетични животни, т.е. на животни, при които са интегрирани трайно генетични информации, чужди за техните собствени геноми и произхождащи от други генетични системи, е било и все още е обект от първостепенно значение за изучаване на генетичната регулация както за химически, така и за терапевтични цели и за развъждане на домашни животни, риби, ехинодерми и амфибии.

Наистина е възможно да се създадат животни с отделни преимуществени характеристики, такива като скорост на растеж, или устойчивост към някои заболявания, в случай на животни за разплод, или обратно - предразположение към някои заболявания, в случай на животни, използвани за експериментирание на нови лекарства. Първите опити за получаване на трансгенетични животни датират от средата на седемдесетте години.

Тези опити са свързани главно с манипулации на ембриони от мишки или с клетъчни култури и с директното въвеждане на ДНК (например SV40) в бластоцитните кухини на мишки, както е описано от M.H.L. & A. McLaren в *Experimental Cell Research* (1974) 86, 1-8 и от R.Jaenisch & B.Mintz (1974) в

Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1974) 71, 1250-54.

Получените резултати обаче са незадоволителни, по-специално поради трудността на използваните техники.

5 През 1980 г. John W.Gordon и други описват в *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1980), 77 № 12, 7380-84 една нова техника за генетично трансформиране на ембриони от мишка чрез микроинжектиране на клонирана ДНК в пронуклеите на оплодени ооцити.

Така тренираните зиготи се реимплантират в матката псевдобременна майка и бременността се довежда до край.

15 С помощта на тази техника, която е подобрена през последните години, се показва, че е възможно екзогенна ДНК да се въведе в соматични и зародишни клетки на мишка при получаване на трансгенетични животни.

20 Типичен пример за трансгенетични животни, получени с техниката на микроинжектирането на екзогенна ДНК в оплодени яйца и използвани за експериментална антитуморна терапия, са мишките, описани в US 4 736 866, които показват в техните соматични и зародишни клетки наличие на онкогенна последователност.

25 Микроинжекционната техника се експериментира в областта на развъждането, но няма достатъчно информация за постигнатите крайни резултати.

30 Микроинжектирането на ДНК в оплодени ооцити е във всеки случай сложна и скъпа техника, със слаба ефективност, поради високата степен на аборт, на мозъчност при получените животни и изразената им стерилност.

35 През 1987 г. е предложена друга техника /WO 87/05325/, използваща способността на спермите да пренасят в яйцеклетките субстанции, прикрепени към тяхната повърхност.

40 Съответният генетичен материал, под формата на нуклеинови киселини, се улавя в изкуствени мехурчета (везикули) или се процедира със специфични протеини и неорганични соли под формата на гранули. Така получените обвивки, съдържащи генетичния материал, след това се прикрепят към повърхността на спермата и с нея се пренасят в яйцеклетката.

45 Няма доказателства за използването на посочената техника, която е сложна, поради множеството материали и операции, които се изискват за осъществяването ѝ.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Основният технически проблем, който се решава с настоящото изобретение е въвеждането на ДНК, третирана в съответствие с познатите техники за рекомбинантна ДНК, в клетките на животно, принадлежащо към животински видове, които фактически не притежават типичните последователности на въвежданата екзогенна ДНК, при условие, че генетичната информация, съдържаща се в посочената рекомбинантна ДНК, се интегрира трайно в генома на третирания индивид и поради това може да бъде пренасяна в поколението на индивида.

Методът за въвеждане на клонирана ДНК в клетките на различните видове съгласно изобретението се основава на експерименталното наблюдение, а именно изненадващата леснина, с която молекули, дори и с големи размери, успяват да проникнат в главата на сперматозоида.

Това свойство, типично за сперматозоидите, както на бозайници, така и на други животински видове, се използва за модифициране на сперматозоидите, въвеждайки в тях клонираната ДНК, която трябва да бъде пренесена.

С модифицираните сперматозоиди след това се оплождат съответните ооцити чрез техниките за изкуствено осеменяване, използвани при немодифицирани сперматозоиди.

Съгласно изобретението сперматозоидите на видовете, в които се желае да се въведе генетична информация, външна за техния собствен геном и изхождаща от други системи, се използват като вектори за пренасяне на чуждата ДНК.

Един от възможните пътища за провеждане на този процес съгласно настоящото изобретение включва следните етапи:

(а) изготвяне на водна суспензия от сперматозоиди;

(б) трансформиране на сперматозоидите с клонирана ДНК;

(с) оплождане *in vitro* на ооцити с помощта на модифицираните сперматозоиди;

(д) имплантиране на оплодените ооцити в псевдобременни женски от избраните видове.

Съгласно друг вариант на изобретението

модифицираните сперматозоиди могат да бъдат използвани директно за оплождане на животни, без да се преминава през оплождане *in vitro* на ооцита и последващо имплантиране на същия в псевдобременни женски.

Тази форма за реализиране на изобретението е особено удобна в случай, че методът се използва в развъждането.

Методът, съгласно изобретението, е много по-прост, много по-бърз и не така скъп, както техниката на микроинжектиране и не води до аборти, които са твърде чести при техниката на микроинжектирането.

Следва подробно описание на изобретението във връзка с модифицирането на сперматозоиди от мишки.

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Използват се мишки, т.к. цялата лабораторна техника за тяхното оплождане *in vitro* и за изучаване на интегрирането и експресията на техните гени са обстойно докладвани в научната литература.

Като екзогенна ДНК се използва р SV2 CAT, Dolyoma и човешки растежен ген, защото техните рестрикционни карти са описани в литературата и съдържат основни последователности, които естествено не са представени в генома на мишката.

Идентифицирането на тези последователности при позитивни мишки, т.е. при мишки, получени от яйце, оплодено с третирани сперматозоиди, позволява да се установи без съмнение, че клонираната ДНК е наистина въведена в главата на третирания сперматозоиди и чрез тях - в оплодените яйца и следователно е интегрирана в генома на получените трансгенетични индивиди.

(а) Приготвяне на сперматозоидите

Приготвя се суспензия от сперматозоиди чрез притискане на епидидима на мъжка мишка в 1 ml РМ буфер (приготвен, както е описано от D.G. Whittingham. Culture of Mouse-ov- (1971)-J.Reprod.Fert.Supp.14, p.7-21).

Суспензията от сперматозоиди се центрофугира така, че да се отделят сперматозоидите, които се ресуспендират в 1 ml буфер.

Посочената по-горе обработка се повтаря 5 пъти, за да се промият сперматозоидите и да се осигури пълното отстраняване на семен-

ната течност. Буферът се модифицира чрез отстраняване на натриевия лактат, пеницилина и стрептомицина, като моонатриевият фосфат се замества с 0,15 mM двунатриев фосфат и като се изменя количеството натриев хлорид на 120 mM. След това суспензията от сперматозоиди се разрежда до концентрация от 1-2 милиона/ml и се инкубира в течение на 30 min до 3 h при температура от 20 до 37°C във въздух, съдържащ над 5 до 10% въглероден диоксид.

(b) ДНК трансформиране на сперматозоидите

Към разредената суспензия от сперматозоиди, в части от 500 µl, се добавя разтворът от клонираната, циркулярна ДНК, която е предназначена за въвеждане в сперматозоидите, след което сместа се инкубира отново за най-малко 30 min при температура от 0 до 37°C във въздух, съдържащ над 5% до 10% въглероден диоксид.

Поради намалената активност на ендогенната нуклеаза на сперматозоидите, въвеждането на ДНК в сперматозоидите е по-лесно при по-ниска температура, на времето за инкубация се удължава над 30 min.

Разтворът на клонираната циркулярна ДНК се добавя в такова количество, че да се получи крайна концентрация на сместа на клонираната ДНК между 0,4 и 2 µg/ml.

(c) Оплождане на яйцеклетката

Полово зрели женски мишки се довеждат до суперовулация чрез човешки хорионов гонадотропин и яйцеклетките се извличат от яйцепровода 14,5 h след инжектирането (съгласно метода, описан от B.Hogan и други в "Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual" C.S.M. New York, 1986).

Извлечените от яйцепровода яйцеклетки се въвеждат в части от 500 µl от трансформираните сперматозоиди и се инкубират в течение на 5 до 10 h при температура от 20 до 37°C във въздух, съдържащ над 5 до 10% въглероден диоксид. В края на споменатия период яйцата се промиват с M16 буфер (приготвен както е описано от Whittingam, виж т. (a) по-горе) и се оставят цяла нощ в 50 µl от същия буфер.

След 24 h ембрионите се пренасят хирургически в стадий на две клетки в яйцепроводите на псевдобременни женски.

Потомците, произхождащи от тези имплантати, на възраст от 3 седмици, се подла-

гат на ампутация на крайния опасен фрагмент, от който се екстрахира ДНК, която се анализира с помощта на Southern blot (пренос по Southern) описано в книгата "Molecular Cloning": A Laboratory Manual" от T.Manias et al., C.S.M., New York 1984.

Този анализ позволява да се идентифицират позитивни индивиди, т.е. онези, чийто геном притежава интегрирани или в епизомична форма, една или повече копия от същата клонирана ДНК, въведена в изходните сперматозоиди.

Добивът на позитивни индивиди, получени, като се следва методът съгласно настоящото изобретение, е винаги по-висок от 30 до 70% и, нещо повече, между тях няма стерилни индивиди.

Последващото генетично характеризирание на позитивните животни се извършва с два аналитични метода - рестрикционен и секвениране.

Анализът на геномната ДНК при позитивните мишки се извършва по два метода:

Рестрикционен анализ

Рестрикционният анализ на ДНК се извършва чрез специфични рестрикционни ензими, които позволяват подразделянето на геномната ДНК на фрагменти. Получените фрагменти след това се фракционират чрез електрофореза и се пренасят върху нитроцелулозен филтър съгласно известната Southern blot техника. След това филтърът се третира с пробата, специфична за първоначалната клонирана ДНК, използвана за трансформиране на сперматозоидите, радиобележана с P³² и експонирана върху чувствителен на X-лъчи филм.

Филмът се експонира в съответствие с местата, където радиоактивната проба е била свързана с филтъра, т.е. в съответствие с всяка радиоактивна ДНК връзка, като се оставя сигнал за всеки ДНК фрагмент.

Наличието на един или повече сигнали, техният брой и размерите на ДНК фрагментите, които те представят, позволяват да се направи изводът, че съществуват последователности, които са аналогични на позитивната проба на миши геном и да се определи рестрикционна карта.

Аналогията между тази карта и онази на клонираната ДНК, въведена в сперматозоидите, от които произхожда позитивната

мишка доказва, че изходните последователности на клона са интегрирани в трансгенетичния миши геном.

Анализ на последователността

За да се анализира последователността на базите, състоящи позитивния миши геном, равни количества (15 µg) геномна ДНК на позитивна мишка и на pUC13 плазмид, резистентен на ампицилин, се скъсват с рестрикционен ензим EcoRI.

Двете скъсани ДНК след това се смесват, рециркулират се и се въвеждат в бактерии *Escherichia coli* HB101, които след това се култивират върху Агар + Ампицилин.

Положителните колонии (т.е. тези, които съдържат клониран фрагмент) се отделят, амплифицират и пречистват. След това, клонираният фрагмент се отделя от pUC13 вектора чрез смилане с EcoRI и 626 бази се секвенират от него, като се използва методът на Лангер.

По този начин става възможно да се установи, че изходният клон е пренесен от сперматозоидите в оплоденото яйце и след това интегриран в генома на получения в резултат индивид.

Освен двата метода, посочени по-горе, се анализират сперматозоидите след тяхното трансформиране с клонираната ДНК до доказване разполагането на екзогенната ДНК.

За тази цел се използва белязана с H³ ДНК и различни съизмерими части от сперматозоидните разтвори, след тяхната инкубация с белязаната ДНК, се радиоавтографира с оптичен и електронен микроскоп.

Получените резултати показват, че клонираната ДНК е специфично локализирана вътре в главата на сперматозоидите в субекваториално положение.

Следите от радиоактивност в другите зони на сперматозоидите са незначителни.

Тъй като е известно, че акрозомалната реакция на сливане между сперматозоид и ооцит, в момента на оплождане, (с пренасяне на генетичен материал от сперматозоида в яйцето) настъпва точно в тази зона, то се приема също, че екзогенната ДНК се пренася в същото време и по същия начин, както собствената за видовете ДНК. Този механизъм може да обясни изненадващата ефективност на метода, съгласно изобретението.

Патентни претенции

1. Метод за произвеждане на нечовешки трансгенетични животни, чиито зародишни и соматични клетки съдържат последователност на екзогенна ДНК и споменатото животно е способно да възпроизвежда плодородни потомства, характеризиращ се с това, че ооцитите се оплождат със сперматозоиди на животното, предназначено за модифициране, като сперматозоидите първо се модифицират чрез въвеждане в главата на сперматозоида на екзогенна ДНК, след което се използват за оплождане на ооцитите, а ембрионите се пренасят директно, не хирургически, в животно-то реципиент.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че сперматозоидите на животното, предназначено за модифициране, се модифицират чрез въвеждане в главата на сперматозоида на екзогенна ДНК, след което модифицираните сперматозоиди се използват директно за изкуствено оплождане на животното, без преминаване през *in vitro* оплождане на ооцити и без хирургическа или нехирургическа имплантация на оплодените ооцити или ембриони.

3. Метод, съгласно претенции 1 и 2, при който се получават сперматозоиди, приготвя се водна суспензия от тях чрез буферен разтвор, суспензията се инкубира с клонирана ДНК и получените модифицирани сперматозоиди се използват за оплождане на ооцитите.

4. Метод, съгласно претенции 1 и 2, характеризиращ се с това, че водната суспензия от сперматозоиди се буферира с FM буфер, разрежда се до концентрация на сперматозоидите от 1-2 милиона/ml и се инкубира при температура 20 до 37°C за период от 30 min до 3 h, във въздух, съдържащ над 5% до 10% въглероден диоксид.

5. Метод съгласно претенции 1 и 2, характеризиращ се с това, че разтворът на клонираната ДНК, подлежащ на въвеждане в сперматозоидите, се добавя към споменатата инкубирана водна суспензия от сперматозоиди и се инкубира допълнително за най-малко 30 min при температура от 0 до 37°C, като разтворът се добавя в такова количество, че крайната концентрация на клонираната ДНК в сместа да е от 0,4 до 2 µg/ml.

6. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че ооцитите, подлежащи на оплождане, се добавят към инкубираната водна суспензия от сперматозоиди и сместа се

инкубира за 5 до 10 h при температура от 20 до 37°C във въздух, съдържащ над 5% до 10% въглероден диоксид.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д.Кацарова

Редактор: Е.Синкова

Пор. 38121

Тираж: 40 ЗС