



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 989**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
A61K 35/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96928586 .5**
96 Fecha de presentación : **30.08.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **0847237**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.1998**

54 Título: **Oocitos inactivados que son receptores de citoplastos para transferencia nuclear.**

30 Prioridad: **31.08.1995 GB 9517779**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **ROSLIN INSTITUTE (EDINBURGH)**
Roslin, Midlothian EH25 9PS, GB

72 Inventor/es: **Campbell, Keith, Henry, Stockman y**
Wilmut, Ian

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Oocitos inactivados que son receptores de citoplastos para transferencia nuclear.

5 Esta invención se refiere a la generación de mamíferos no humanos incluyendo, pero no limitado a mamíferos no humanos genéticamente seleccionados y/o modificados, y a células útiles para su generación.

10 La reconstrucción de embriones de mamíferos no humanos por la transferencia de un núcleo donante no humano a un ovocito enucleado no humano o un cigoto de célula no humana permiten producir individuos genéticamente idénticos. Esto tiene ventajas claras tanto para la investigación (es decir, como controles biológicos) como también en aplicaciones comerciales (es decir, multiplicación de ganado genéticamente valioso, uniformidad de productos de carne, gestión de animales).

15 La reconstrucción de embriones por transferencia nuclear se propuso por primera vez (Spemann, *Embryonic Development and Induction* 210-211 Hofner Publishing Co., New York (1938)) con el fin de contestar a la pregunta de equivalencia nuclear o ¿cambian los núcleos durante el desarrollo? Mediante la transferencia de núcleos de estados embrionarios cada vez más desarrollados, estos experimentos se diseñaron para determinar en que punto los núcleos están limitados para su potencial de desarrollo. Debido a limitaciones técnicas y a la desafortunada muerte de Spemann, estos estudios no se completaron hasta 1952, cuando se demostró en la rana que algunos núcleos podían dirigir el desarrollo a un adulto sexualmente maduro (Briggs and King, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38 455-461 (1952)).

20 Sus descubrimientos condujeron al concepto actual de que los núcleos totipotentes equivalentes de un solo individuo, cuando se transfieren a un huevo enucleado, podrían dar lugar a individuos "genéticamente idénticos". En el verdadero sentido del significado, estos individuos no serían clones puesto que pueden variar contribuciones citoplasmáticas desconocidas en cada uno y también habría que demostrar la ausencia de cualquier reorganización cromosómica.

25 Desde la demostración de la clonación de embriones en anfibios, se han aplicado técnicas similares a especies de mamíferos. Estas técnicas entran en dos categorías:

1) transferencia de un núcleo donante a un ovocito en metafase II madurado al que se le ha quitado su ADN cromosómico, y

30

2) transferencia de un núcleo donante a un cigoto de una célula fertilizada al que se le han quitado ambos pronúcleos. En los ungulados el primer procedimiento ha sido el método elegido, ya que no se ha descrito el desarrollo usando el último, más que cuando los pronúcleos se intercambian.

35

La transferencia del núcleo donante al citoplasma del ovocito normalmente se logra induciendo la fusión celular. En los ungulados la fusión se induce por aplicación de un pulso eléctrico DC a lo largo del plano de contacto/fusión de la pareja. El mismo pulso que induce la fusión celular también activa el ovocito receptor. Después de la reconstrucción del embrión, el posterior desarrollo depende de un gran número de factores que incluyen la capacidad del núcleo para dirigir el desarrollo, es decir, totipotencia, competencia para el desarrollo del citoplasma receptor (es decir, maduración de ovocito), activación de ovocito, cultivo del embrión (revisado, Campbell and Wilmut en *Vth World Congress on Genetics as Applied to Livestock* 20 180-187 (1994)).

40

Además de lo anterior, se ha demostrado que el mantenimiento de la ploidía correcta durante el primero ciclo celular del embrión reconstruido tiene una gran importancia (Campbell *et al.*, *Biol. Reprod.* 49 933-942 (1993); Campbell *et al.*, *Biol. Reprod.* 50 1385-1393 (1994)). Durante un solo ciclo celular debe replicarse todo el ADN genómico solo una vez antes de la mitosis. Si algo del ADN no se replica o se replica más de una vez, entonces la ploidía de ese núcleo en el momento de la mitosis será incorrecta. Los mecanismos por los que la replicación está restringida a una vez durante cada ciclo celular no están claros, sin embargo, algunas líneas de investigación han implicado que el mantenimiento de una membrana nuclear intacta es crucial para este control. Los sucesos morfológicos que se producen en el núcleo donante después de la transferencia a un ovocito en metafase II enucleado se han estudiado en una serie de especies que incluyen el ratón (Czolowiska *et al.*, *J. Cell Sci.* 69 19-34 (1984)), conejo (Collas and Robl, *Biol. Reprod.* 45 455-455 (1991)), cerdo (Prather *et al.*, *J. Exp. Zool.* 225 355-358 (1990)), vaca (Kanka *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 29 110-116 (1991)). Inmediatamente tras la fusión, la envuelta del núcleo donante se rompe (REND) y los cromosomas condensan prematuramente (CCP). Estos efectos son catalizados por una actividad citoplasmática denominada factor promotor de maduración/mitosis/meiosis (MPF). Esta actividad se encuentra en todas las células mitóticas y meióticas, y llega a una actividad máxima en la metafase. Los ovocitos de mamífero maduros se detienen en la metafase de la 2ª división meiótica (metafase II) y tienen una actividad de MPF alta. Tras la fertilización o activación, la actividad de MPF disminuye, la segunda división meiótica se completa y el segundo cuerpo polar es extruido, entonces la cromatina se descondensa y se produce la formación pronuclear. En la transferencia nuclear, los embriones se reconstruyen cuando los niveles de MPF son altos y se produce la REND y CCP; cuando la actividad de MPF disminuye a estos sucesos les sigue la descondensación de la cromatina y reformación nuclear y posterior replicación del ADN. En los embriones reconstruidos la ploidía correcta se puede mantener en una de dos formas; primero, por transferencia de núcleos en una etapa definida del ciclo nuclear, p. ej., núcleos diploides de células en G1, a ovocitos en metafase II en el momento de la activación; o segundo por activación del ovocito receptor y transferencia del núcleo donante después de la desaparición de la actividad de MPF. En ovejas este último procedimiento ha dado un aumento de la frecuencia de desarrollo a la etapa de blastocito de 21% a 55% de los embriones reconstruidos cuando se usaban blastómeros de embriones de 16 células como donantes nucleares. (Campbell *et al.*, *Biol. Reprod.* 50 1385-1393 (1994)).

45

50

55

60

65

Estas mejoras en la frecuencia de desarrollo de embriones reconstruidos no humanos todavía no han abordado la cuestión de la reprogramación nuclear. Durante el desarrollo algunos genes quedan “silenciados”, es decir, son alterados de modo que ya no son transcritos. Los estudios de silenciamiento han mostrado que este “silenciamiento” se suprime durante la formación de la célula germinal (es decir, se reprograma). Una posibilidad es que esta reprogramación esté afectada por la exposición de la cromatina a factores citoplasmáticos que están presentes en las células que experimentan meiosis. Esto plantea la cuestión de cómo se puede mimetizar esta situación durante la reconstrucción de embriones por transferencia nuclear con el fin de reprogramar el reloj del desarrollo del núcleo donante.

Ahora se ha encontrado que la transferencia nuclear a un ovocito no humano detenido en la metafase II puede dar lugar a un embrión no humano viable si se mantiene la ploidía normal (es decir, diploidía) y si el embrión no humano no es activado en el momento de la transferencia nuclear. El retraso en la activación permite que el núcleo no humano permanezca expuesto al citoplasma del receptor no humano.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reconstituir un embrión de mamífero no humano, comprendiendo el método transferir un núcleo diploide diferenciado no humano a un ovocito enucleado no humano que está detenido en la metafase de la segunda división meiótica, sin activar simultáneamente el ovocito, mantener el núcleo expuesto al citoplasma del receptor no humano durante un periodo de tiempo suficiente para que el embrión sea capaz de dar lugar a un nacido vivo, y posteriormente activar el embrión reconstituido mientras se mantiene la ploidía correcta. En esta etapa, el embrión reconstituido no humano es una sola célula.

En principio, esta invención es aplicable a todos los animales no humanos, en especial mamíferos no humanos, en particular mamíferos placentarios, para los que se prevé actualmente la mayor aplicabilidad comercialmente útil. Es probable que la invención sea más útil con ungulados, en particular ungulados económicamente importantes tales como ganado, ovejas, cabras, búfalos de agua, camellos y cerdos, como medio para clonar animales y como medio para generar animales transgénicos. También debe indicarse que también es probable que la invención sea aplicable a otras especies de animales no humanos económicamente importantes tales como, por ejemplo, caballos, llamas o roedores, p. ej. ratas o ratones, o conejos.

La invención también se puede aplicar en la producción de mamíferos no humanos transgénicos, así como no transgénicos. Los animales no humanos transgénicos se pueden producir a partir de células donantes no humanas genéticamente alteradas. El procedimiento general tiene una serie de ventajas frente a los procedimientos convencionales para producir mamíferos no humanos transgénicos (es decir, genéticamente modificados), que se pueden resumir como sigue:

(1) serán necesarios menos receptores no humanos;

(2) se pueden generar múltiples fuentes singénicas usando células donantes clonales no humanas;

(3) está permitida la sutil alteración genética mediante manipulación dirigida de genes;

(4) todos los animales no humanos producidos a partir de embriones preparados por la invención transmitirán la modificación genética importante a través de la línea germinal, ya que cada animal no humano deriva de un solo núcleo; en contraste, la producción de animales transgénicos no humanos por inyección pronuclear o quimerismo después de inclusión de poblaciones de células madres no humanas por inyección de blastocito produce una proporción de animales no humanos mosaico en los que no todas las células contienen la modificación y pueden no transmitir la modificación a través de la línea germinal; y

(5) las células no humanas se pueden seleccionar por el sitio de la modificación genética (p. ej., integración) antes de la generación del animal completo.

Hay que indicar que el término “transgénico”, en relación con mamíferos no humanos, no debe considerarse que esté limitado a la referencia a mamíferos no humanos que contienen en su línea germinal uno o más genes de otra especie, aunque muchos mamíferos no humanos transgénicos contendrán dicho gen o genes. Antes bien, el término se refiere más ampliamente a cualquier mamífero no humano cuya línea germinal haya sido objetivo de intervención técnica por tecnología de ADN recombinante. Así, por ejemplo, un mamífero no humano en cuya línea germinal se haya suprimido, duplicado, activado o modificado un gen endógeno, es un mamífero no humano transgénico para el propósito de esta invención, tanto como un mamífero no humano en cuya línea germinal se ha añadido una secuencia de ADN exógena.

En realizaciones de la invención en las que el mamífero no humano es transgénico, el núcleo donante no humano está genéticamente modificado. El núcleo donante no humano puede contener uno o más transgenes y la modificación genética puede tener lugar antes de la transferencia nuclear y reconstitución del embrión no humano. Aunque se puede usar la microinyección, análoga a la inyección en el pronúcleo masculino no humano o femenino no humano de un cigoto como método de modificación genética, la invención no está limitada por esta metodología: también se pueden usar técnicas de transformación de masa o transfección, p. ej. electroporación, transfección vírica o lipofección.

En el método de la invención descrito antes, se transfiere un núcleo diploide no humano de un donante no humano a un ovocito receptor enucleado no humano. Son necesarios donantes que sean diploides en el momento de la trans-

ferencia con el fin de mantener la ploidía correcta del embrión reconstituido; por lo tanto, los donantes pueden estar en la fase G1 o preferiblemente, como es el caso de la solicitud de patente PCR de los autores de la invención en tramitación junto con la presente n° PCT/GB96/02099 presentada hoy (que reivindica la prioridad de GB 9517780.4), en la fase G0 del ciclo celular.

El ciclo celular mitótico tiene cuatro fases distintas, G, S, G2 y M. El suceso inicial en el ciclo celular, llamado *inicio*, se produce en la fase G1 y tiene una función única. La decisión o misión de experimentar otro ciclo celular se hace en el *inicio*. Una vez que una célula ha pasado por el *inicio*, pasa por el resto de la fase G1, que es la fase de presíntesis de ADN. La segunda etapa, la fase S, es cuando se produce la síntesis de ADN. A esta le sigue la fase G2 que es el periodo entre la síntesis de ADN y la mitosis. La propia mitosis ocurre en la fase M. Las células quiescentes (que incluyen células en las que la quiescencia se ha inducido así como aquellas células que son quiescentes naturales, tales como algunas células completamente diferenciadas) normalmente se considera que no están en ninguna de estas cuatro fases del ciclo; normalmente se describe como que están en un estado G0, para indicar así que no progresarían normalmente a través del ciclo. Los núcleos de células G0 quiescentes, como los núcleos de células G1 tienen un contenido de ADN diploide; y en la presente invención se pueden usar ambos núcleos diploides.

En relación con lo anterior, se cree que no hay limitación significativa en las células no humanas que se pueden usar en donantes de núcleos: se pueden usar células total o parcialmente diferenciadas o células no diferenciadas, así como células que se cultivan *in vitro* o extraídas *ex vivo*. La única limitación es que las células donantes no humanas tengan contenido de ADN normal y sean cariotípicamente normales. Se describe una fuente preferida de células en la solicitud de patente PCT de los autores de la invención en tramitación junto con la presente n° PCT/GB95/02095, publicada como WO 96/07732. Se cree que todas dichas células no humanas normales contienen toda la información genética necesaria para la producción de un mamífero no humano adulto. La presente invención permite que esta información se proporcione al embrión no humano en desarrollo alterando la estructura de cromatina de modo que el material genético pueda redirigir el desarrollo.

Las células receptoras no humanas útiles en la invención son ovocitos no humanos enucleados que están detenidos en la metafase de la segunda división meiótica. En la mayoría de los vertebrados, la maduración del ovocito continúa *in vivo* a esta etapa bastante final del proceso de maduración del huevo y entonces se detiene. En la ovulación, el ovocito detenido se libera del ovario (y si se produce la fertilización, el ovocito es estimulado naturalmente para completar la meiosis). En la práctica de la invención, los ovocitos pueden hacerse madurar *in vitro* o *in vivo* y se recogen cuando aparece el primer cuerpo polar o tan pronto como sea posible después de la ovulación, respectivamente.

Más recientemente, se han usado diferentes procedimientos para intentar separar los cromosomas con un mínimo de citoplasma. Se ha encontrado que la aspiración del primer cuerpo polar y el citoplasma vecino elimina el aparato de la metafase II en el 67% de los ovocitos de oveja. (Smith & Wilmut, *Biol. Reprod.* 40 1027-1035 (1989)). Sólo el uso del método del fluorocromo específico de ADN (Hoechst 33342) proporcionaba la enucleación garantizada con la mínima reducción en el volumen de citoplasma (Tsunoda *et al.*, *J. Reprod. Fertil.* 82 173 (1988)). En especies de ganado, probablemente este es el procedimiento rutinario usado actualmente (Prather & First *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 41 125 (1990), Westhusin *et al.*, *Biol. Reprod.* (Suppl.) 42 176 (1990)).

Ha habido pocas publicaciones de procedimientos no invasivos para la enucleación en mamíferos, mientras que en anfibios se usa la irradiación con luz ultravioleta como un procedimiento rutinario (Gurdon Q., *J. Microsc. Soc.* 101 299-5 311 (1960)). No hay publicaciones detalladas del uso de este procedimiento en mamíferos, aunque durante el uso del fluorocromo específico de ADN se ha indicado que la exposición de ovocitos de ratón a la luz ultravioleta durante más de 30 segundos reducía el potencial de desarrollo de la célula (Tsunoda *et al.*, *J. Reprod. Fertil.* 82 173 (1988)).

Como se ha descrito antes, la enucleación se puede lograr físicamente, mediante la eliminación real del núcleo, pronúcleo o placa de la metafase no humanos (dependiendo de la célula receptora), o funcionalmente, tal como por la aplicación de radiación ultravioleta u otro factor para la enucleación.

Después de la enucleación, el núcleo donante no humano se introduce por fusión en células donantes no humanas en condiciones que no inducen la activación del ovocito, o por inyección en condiciones no activantes. Con el fin de mantener la ploidía correcta del embrión no humano reconstruido, el núcleo donante no humano debe ser diploide (es decir, en la fase G0 o G1 del ciclo celular) en el momento de la fusión.

Una vez se han preparado las células donante no humana y receptora no humana, es necesario transferir el núcleo no humano de la primera a esta última. De forma más conveniente, la transferencia nuclear se efectúa por fusión. La activación no debe tener lugar en el momento de la fusión.

Tres métodos establecidos que se han usado para inducir la fusión son:

- (1) exposición de células a productos químicos que promueven la fusión, tales como polietilenglicol;
- (2) el uso de virus inactivado, tal como virus Sendai; y
- (3) el uso de estimulación eléctrica.

La exposición de las células a productos químicos que promueven la fusión tales como polietilenglicol u otros glicoles es un procedimiento rutinario para la fusión de células somáticas, pero no se ha usado ampliamente con embriones. Puesto que el polietilenglicol es tóxico, es necesario exponer las células durante un periodo mínimo y la necesidad de poder eliminar el producto químico rápidamente puede hacer necesario la eliminación de la zona pelúcida (Kanka *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.* 29 110-116 (1991)). En experimentos con embriones de ratón, el virus Sendai inactivado proporciona un medio eficaz para la fusión de células de embriones en etapa de división (Graham Wistar, *Inst. Symp. Monogr.* 9 19 (1969)), con la ventaja experimental adicional de que no se induce activación. En los ungulados, la fusión normalmente se logra mediante la misma estimulación eléctrica que se usa para inducir la activación partenogenética (Willadsen, *Nature* 320 (6) 63-65 (1986), Prather *et al.*, *Biol. Reprod.* 37 859-866 (1987)). En estas especies, el virus Sendai induce la fusión en una proporción de los casos, pero no es suficientemente fiable para la aplicación rutinaria (Willadsen, *Nature* 320 (6) 63-65 (1986)).

Aunque la fusión célula-célula es un método preferido para efectuar la transferencia nuclear, no es el único método que se puede usar. Otras técnicas adecuadas incluyen la microinyección (Ritchie and Campbell, *J. Reproduction and Fertility*, Abstract Series No. 15, p60).

En una realización preferida de la invención, la fusión de la pareja ovocito y carioplasto no humanos, se lleva a cabo en ausencia de activación por electropulsación en solución de manitol 0,3 M o solución de sacarosa 0,27 M; alternativamente, el núcleo no humano se puede introducir por inyección en un medio sin calcio. La edad de los ovocitos no humanos en el momento de la fusión/inyección y la ausencia de iones calcio del medio de fusión/inyección, evitan la activación del ovocito receptor.

En la práctica, es mejor enuclear y llevar a cabo la transferencia tan pronto como sea posible después de que el ovocito no humano alcance la metafase II. El momento en el que esto ocurre después del inicio de la maduración (*in vitro*) o del tratamiento hormonal (*in vivo*) dependerá de la especie. Para el ganado u ovejas, la transferencia nuclear debe tener lugar preferiblemente en 24 horas; para cerdos, en 48 horas; ratones, en 12 horas; y conejos en 20-24 horas. Aunque la transferencia se puede tener lugar más tarde, se hace cada vez más difícil lograrlo a medida que el ovocito envejece. También es deseable una actividad alta de MPF.

Posteriormente, el embrión reconstruido no humano fusionado, que generalmente se devuelve al medio de maduración, se mantiene sin ser activado de modo que el núcleo donante no humano se expone al citoplasma del receptor durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el embrión no humano reconstruido sea capaz, finalmente, de dar lugar a un nacido vivo (preferiblemente de una descendencia fértil).

El periodo de tiempo óptimo antes de la activación varía de una especie a otra y se puede determinar fácilmente mediante experimentación. Para el ganado, es adecuado un periodo de 6 a 20 horas. El periodo de tiempo probablemente no debería ser menor que el que permita la formación de cromosomas, y no debería ser tan largo que la pareja se activara espontáneamente, o en casos extremos que muriera.

Cuando es el momento de la activación, se puede usar cualquier protocolo de activación convencional u otro adecuado. Experimentos recientes han demostrado que los requisitos para la activación partenogenética son más complicados de lo que se había imaginado. Se había supuesto que la activación es un fenómeno de todo o nada y que el gran número de tratamientos que podían inducir la formación de un pronúcleo producían todos "activación". Sin embargo, la exposición de ovocitos de conejo a pulsos eléctricos repetidos, puso de manifiesto que sólo la selección de una serie de adecuada de pulsos y el control del Ca^{2+} eran capaces de promover el desarrollo de ovocitos diploidizados a media gestación. (Ozil, *Development* 109 117-127 (1990)). Durante la fertilización hay aumentos transitorios repetidos de concentración de calcio intracelular (Cutbertson & Cobbold, *Nature* 315 541-542 (1985)) y se cree que los pulsos eléctricos producen aumentos análogos en la concentración de calcio. Hay pruebas de que el patrón de calcio transitorio varía con la especie y se puede anticipar que el patrón óptimo de pulsos eléctricos variará de una forma similar. El intervalo entre pulsos en el conejo es aproximadamente 4 minutos (Ozil, *Development* 109 117-127 (1990)), y en el ratón 10 a 20 minutos (Cutbertson & Cobbold, *Nature* 316 541-542 (1985)), mientras que hay observaciones preliminares en la vaca de que el intervalo es aproximadamente 20 a 30 minutos (Robl *et al.*, en Symposium on Cloning Mammals by Nuclear Transplantation (Seidel ed.), Colorado State University, 24-27 (1992)). En la mayoría de los experimentos publicados la activación se indujo con un solo pulso eléctrico, pero nuevas observaciones sugieren que la proporción de embriones reconstruidos que se desarrollan aumenta por exposición a varios pulsos (Collas & Robl, *Biol. Reprod.* 43 877-884 (1990)). En cualquier caso individual se pueden hacer ajustes rutinarios para optimizar el número de pulsos, la fuerza del campo y la duración de los pulsos y la concentración de calcio del medio.

En la práctica de la invención, la ploidía correcta debe mantenerse durante la activación. Es conveniente inhibir o estabilizar la polimerización de microtúbulos con el fin de prevenir la producción de múltiples pronúcleos, para mantener así la ploidía correcta. Esto se puede lograr por la aplicación de un inhibidor de microtúbulos tal como nocodazol con una concentración eficaz (tal como aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$). La colquicina y colcemida son otros inhibidores de microtúbulos. Alternativamente, se podría usar un estabilizador de microtúbulos, tal como, por ejemplo, taxol.

El componente molecular de los microtúbulos (tubulina) está en un estado de equilibrio dinámico entre los estados polimerizado y no polimerizado. Los inhibidores de microtúbulos tales como el nocodazol previenen la adición de moléculas de tubulina a los microtúbulos, alterando así el equilibrio y conduciendo a la despolimerización de mi-

5 crotúbulos y destrucción del huso. Es preferible añadir el inhibidor de microtúbulos un tiempo suficiente antes de la activación para asegurar la despolimerización completa o casi completa de los microtúbulos. Es probable que veinte a treinta minutos sea suficiente en la mayoría de los casos. Un estabilizador de microtúbulos tal como el taxol previene la rotura del huso y por lo tanto también puede prevenir la producción de múltiples pronúcleos. El uso de un estabilizador de microtúbulos preferiblemente es en condiciones similares a las usadas para los inhibidores de microtúbulos.

El inhibidor o estabilizador de microtúbulos debe permanecer presente después de la activación hasta la formación de los pronúcleos. Debe separarse después, y en cualquier caso antes de que se produzca la primera división.

10 En una realización preferida de la invención, a las 30-42 horas después del inicio de la maduración (bovina y ovina, es decir, 6-18 horas después de la transferencia nuclear), los ovocitos no humanos reconstruidos se ponen en medio que contiene nocodazol (5 µg/ml) y se activan usando protocolos convencionales. La incubación en nocodazol se puede continuar durante 4-6 horas después del estímulo de activación (dependiendo de la especie y la edad del ovocito).

15 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar un mamífero no humano, comprendiendo el procedimiento:

(a) reconstituir un embrión de mamífero no humano como se ha descrito antes; y

20 (b) hacer que se desarrolle un mamífero no humano hasta el final a partir del embrión; y

(c) opcionalmente, reproducción del mamífero no humano así formado.

La etapa (a) se ha descrito antes con profundidad.

25 La segunda etapa, la etapa (b) en el método de este aspecto de la invención es hacer que se desarrolle un mamífero no humano hasta el final a partir del embrión. Esto se puede hacer directa o indirectamente. En el desarrollo directo, el embrión no humano reconstituido de la etapa (a) se deja simplemente que se desarrolle sin ninguna intervención más allá de cualquiera que pueda ser necesaria para que se produzca el desarrollo. Sin embargo, en el desarrollo indirecto el embrión no humano puede ser manipulado más antes de que tenga lugar el desarrollo completo. Por ejemplo, el embrión no humano puede escindir-se y las células expandirse clonalmente, con el propósito de mejorar el rendimiento.

30 Alternativa o adicionalmente, se puede lograr aumentar los rendimientos de embriones no humanos viables mediante la presente invención por expansión clonal de donantes no humanos y/o si se usa el proceso de transferencia (nuclear) seriada. La limitación en la tasa de formación de blastocitos no humanos lograda hasta ahora puede deberse al hecho de que una mayoría de los embriones no humanos no se “reprograman” (aunque lo hace un número aceptable). Si este es el caso, entonces la tasa se puede mejorar como sigue. Cada embrión no humano que se desarrolla por sí mismo se puede usar como un donante nuclear no humano en la etapa celular 32-64; alternativamente, se pueden usar células de la masa celular interna en la etapa de blastocito. Si estos embriones no humanos reflejan realmente los que tienen expresión génica reprogramada y esos núcleos están de hecho reprogramados (como parece probable), entonces cada embrión no humano en desarrollo puede multiplicarse de esta forma por la eficacia del proceso de transferencia nuclear. El grado de potenciación que probablemente puede lograrse, depende del tipo de célula. En ovejas, se puede obtener fácilmente 55% de embriones en estado de blastocito por transferencia de un solo blastómero de un embrión de 16 células a un ovocito “receptor universal” preactivado. Por lo tanto es razonable plantear la hipótesis de que cada 35 embrión no humano desarrollado a partir de una sola célula podría dar lugar a ocho en la etapa de 16 células. Aunque estas cifras son sólo una guía somera, está claro que en las etapas de desarrollo finales, el alcance del beneficio dependerá de la eficacia del procedimiento en esa etapa.

40 Aparte de la cuestión de la viabilidad de mejorar el rendimiento, el embrión no humano reconstituido puede cultivarse *in vivo* o *in vitro* a blastocito.

La experiencia sugiere que los embriones no humanos obtenidos por transferencia nuclear son diferentes de los embriones normales y a veces se benefician o incluso requieren condiciones de cultivo *in vivo* distintas de aquellas en las que los embriones normalmente se cultivan (al menos *in vivo*). No se conoce la razón de esto. En la multiplicación rutinaria de embriones bovinos, los embriones reconstituidos (muchos de ellos de una vez) se han cultivado en oviductos de oveja durante 5 a 6 días (como describe Willadsen, en *Mammalian Egg Transfer* (Adams, E.E., ed.) 185 CRC Press, Boca Raton, Florida (1982)). Sin embargo, en la práctica de la presente invención, con el fin de proteger el embrión no humano, se sumergirá preferiblemente en un medio protector tal como agar antes de transferirlo y después se diseccionará del agar después de recuperarlo del receptor no humano temporal. La función del agar u otro medio protector es doble: primero, actúa como una ayuda estructural para el embrión no humano manteniendo junta la zona pelúcida; y segundo, actúa como una barrera para las células no humanas del sistema inmunitario del animal receptor. Aunque este procedimiento aumenta la proporción de embriones no humanos que forman blastocitos, tiene la desventaja de que se puede perder una serie de embriones.

65 Si se usan condiciones *in vitro*, las que se usan habitualmente en la técnica son bastante aceptables.

En la etapa de blastocito, puede cribarse el embrión no humano para que sea adecuado para el desarrollo hasta el final. Normalmente, esto se hará cuando el embrión no humano es transgénico y se ha llevado a cabo el cribado y

selección de integrantes estables. También puede llevarse a cabo en esta etapa el cribado de marcadores genéticos no transgénicos. Sin embargo, puesto que el método de la invención permite cribar los donantes no humanos en una etapa anterior, en general se preferirá esto.

Después del cribado, si ha tenido lugar el cribado, se deja que el embrión blastocito se desarrolle hasta el final. Esto en general se hará *in vivo*. Si el desarrollo hasta blastocito ha tenido lugar *in vitro*, entonces la transferencia al animal no humano receptor final tiene lugar en esta etapa. Si el desarrollo del blastocito ha tenido lugar *in vivo*, aunque en principio el blastocito no humano puede dejarse desarrollar hasta el final en el hospedante del preblastocito, en la práctica normalmente el blastocito se sacará del receptor del preblastocito (temporal) y después de disección del medio protector, se transferirá al receptor del postblastocito (permanente).

En la etapa opcional (c) de este aspecto de la invención, los mamíferos no humanos pueden reproducirse a partir del mamífero no humano preparado por las etapas precedentes. De esta forma, un mamífero no humano puede usarse para establecer una manada o rebaño de mamíferos no humanos que tienen la o las características genéticas deseadas.

Los mamíferos no humanos producidos por transferencia de núcleos no humanos de una fuente de células no humanas genéticamente idénticas, comparten el mismo núcleo, pero no son estrictamente idénticos puesto que derivan de diferentes ovocitos humanos. La importancia de este origen diferente no está clara, pero puede afectar a las características comerciales. El análisis reciente del ADN mitocondrial de vacas lecheras en el Iowa State University Breeding Herd puso de manifiesto la asociación con la leche y el rendimiento reproductivo (Freeman & Beitz, en *Symposium on Cloning Mammals by Nuclear Transplantation* (Seidel, G. E. Jr., ed.) 17-20, Colorado State University, Colorado (1992)). Queda por confirmar que hay efectos similares en toda la población de ganado y considerar si es posible o es necesario en situaciones específicas considerar la selección de ovocitos no humanos. En el campo de la reproducción de ganado, la capacidad de producir un gran número de embriones no humanos a partir de donantes con gran importancia genética puede tener un considerable valor potencial en la propagación de la mejora genética por los rebaños nacionales. La escala de aplicación dependerá del coste de cada embrión y la proporción de embriones transferidos que pueden desarrollarse hasta el final.

A modo de ilustración y resumen, el siguiente esquema expone un procedimiento típico por el cual se pueden preparar mamíferos no humanos transgénicos y no transgénicos. Se puede considerar que el procedimiento implica cinco etapas:

(1) aislamiento de células donantes diploides no humanas;

(2) opcionalmente, transgénesis, por ejemplo por transfección con construcciones adecuadas, con o sin marcadores seleccionables;

(2a) opcionalmente cribado y selección de integrantes estables - omitir para microinyección;

(3) reconstitución del embrión no humano por transferencia nuclear;

(4) cultivo, *in vivo* o *in vitro*, a blastocito;

(4a) opcionalmente cribado y selección de integrantes estables - omitir si se ha hecho 2a - y otras características deseadas;

(5) transferencia si es necesario al receptor no humano final.

Este protocolo tiene una serie de ventajas frente a métodos previamente publicados de transferencia nuclear:

1) La cromatina del núcleo donante no humano se puede exponer al citoplasma meiótico del ovocito receptor no humano en ausencia de activación durante periodos de tiempo adecuados. Esto puede aumentar la "reprogramación" del núcleo donante no humano alterando la estructura de la cromatina.

2) La ploidía correcta del embrión no humano reconstruido se mantiene cuando se transfieren los núcleos en G0/G1.

3) Estudios previos han mostrado que la sensibilidad a la activación de ovocitos bovinos/ovinos aumenta con la edad. Un problema que se ha observado previamente es que en ovocitos envejecidos no enucleados se produce la duplicación de los cuerpos polares del huso meiótico y se observan husos multipolares. Sin embargo, se describe que en embriones no humanos reconstruidos y mantenidos con niveles altos de MPF, aunque se produce la rotura de la envuelta nuclear y la condensación de la cromatina, no se observa huso organizado. Los cromosomas condensados prematuramente permanecen en un haz apretado, y por lo tanto puede aprovecharse el proceso de envejecimiento y aumentar la respuesta a la activación del ovocito no humano reconstruido sin afectar adversamente la ploidía del embrión no humano reconstruido.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención lo son para cualquier otro aspecto, cambiando lo que haya que cambiar.

La invención ahora se describirá con referencia a los ejemplos que acompañan que se proporcionan con el propósito de ilustrar y no debe considerarse que sean limitantes de la presente invención. En la siguiente descripción se hace referencia al dibujo que acompaña, en el que:

La Figura 1 muestra la tasa de maduración de ovocitos bovinos *in vitro*.

Ejemplo 1

Procedimiento "MAGIC" usando ovocitos bovinos

Los ovocitos receptores objeto de este procedimiento experimental se denominan receptores MAGIC (por sus siglas en inglés *Metaphase Arrested G1/G0 Accepting Cytoplasm*, citoplasma receptor de G1/G0 detenido en metafase).

Se estudiaron los sucesos nucleares y citoplasmáticos durante la maduración del ovocito *in vitro*. Además, también se investigaron las funciones de la fusión y activación en embriones reconstruidos a diferentes edades. Los estudios han mostrado que la maduración del ovocito es asíncrona; sin embargo, se puede hacer una selección morfológica de una población de ovocitos maduros a las 18 horas (Figura 1).

Selección morfológica de ovocitos

En la figura 1 los ovarios se obtuvieron de un matadero local y se mantuvieron a 28-32°C durante el transporte al laboratorio. Se aspiraron los complejos cúmulo-ovocito (COC) de folículos de 3-10 mm de diámetro usando una aguja hipodérmica (1,2 mm de diámetro interno) y se pusieron en recipientes universales de plástico estéril. Los recipientes universales se pusieron en una cámara caliente (35°C) y se dejó que el material folicular se depositara durante 10-15 minutos antes de verter tres cuartos del líquido sobrenadante. El material folicular que quedaba se diluyó con un volumen igual de medio de disección (TCM 199 con sales de Earles (Gibco), kanamicina 75,0 mg/l, Hepes 30,0 mM, pH 7,4, osmolaridad 280 mOsmol/kg de H₂O) complementado con suero bovino al 10%, se transfirió a una placa petri de 85 mm y se buscaron los COC con un microscopio estereoscópico.

Se seleccionaron complejos con al menos 2-3 capas compactas de células cúmulo, se lavaron tres veces en medio de disección y se transfirieron a medio de maduración (medio TC 199 con sales de Earles (Gibco), kanamicina 75,0 mg/l, Hepes 30,0 mM, NaHCO₃ 7,69 mM, pH 7,8, osmolaridad 280 mOsmol/kg de H₂O) complementado con suero bovino al 10% y 1x10⁶ células de la granulosa/ml y se cultivaron en una mesa basculante a 39°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en aire. Se sacaron los ovocitos del disco de maduración y se montaron húmedos en portaobjetos de vidrio limpiados con etanol con cubreobjetos que se unieron usando una mezcla de vaselina al 5% y cera al 95%. Después, los embriones montados se fijaron durante 24 horas en metanol:ácido acético glacial (3:1) recién preparado, se tiñeron con aceto-orceína al 45% (Sigma) y se examinaron mediante contraste de fase y microscopio DIC usando un Nikon Microphot-SA, la gráfica de la figura 1 muestra el porcentaje de ovocitos en MII y aquellos con un cuerpo polar visible.

Activación de ovocitos foliculares bovinos

Si la maduración después se continúa hasta 24 horas, estos ovocitos se activan con una tasa muy baja (24%) en manitol que contiene calcio (Tabla 1a). Sin embargo, la eliminación de calcio y magnesio del medio de electropulsación evita cualquier activación.

La Tabla 1a muestra la activación de ovocitos foliculares bovinos madurados *in vitro* durante diferentes periodos. Se sacaron los ovocitos del medio de maduración, se lavaron una vez en medio de activación, se pusieron en la cámara de activación y se les aplicó un solo pulso eléctrico de 1,25 kV/cm durante 80 µs.

TABLA 1a

Nº de ovocitos (N)	Horas después del inicio de la maduración (hpm) (edad (h))	Formación pronuclear (% de activación)
73	24	24,6
99	30	84,8
55	45	92,7*

*muchos de 2 o más pronúcleos

Respuesta a la activación de ovocitos bovinos enucleados falsos

La Tabla 1b muestra la respuesta a la activación de ovocitos bovinos madurados *in vitro* enucleados falsos aproximadamente 22 horas después de inicio de la maduración (hpm, horas postmaduración). Los ovocitos se trataron exactamente como para la enucleación, se aspiró un pequeño volumen de citoplasma que no contenía placa de la metafase. Después de manipulación, se aplicó a los ovocitos un solo pulso DC de 1,25 kV/cm y se devolvieron al medio de maduración, a las 30 hpm y 42 hpm se montaron grupos de ovocitos, se fijaron y se tiñeron con aceto-orceína. Los resultados muestran el número de ovocitos en cada punto de tiempo de cinco experimentos individuales como el número de células que tienen pronúcleos con respecto al número total de células.

TABLA 1b

EXPERIMENTO	Nº de células que tienen pronúcleos/Nº total de células 30 hpm	Nº de células que tienen pronúcleos/Nº total de células 42 hpm
1	1/8	-
2	0/24	0/30
3	0/21	0/22
4	0/27	0/25
5	0/19	0/1

hpm = horas después del inicio de la maduración

Formación de pronúcleos en ovocitos enucleados

La Tabla 2 muestra la formación pronuclear en ovocitos enucleados fusionados con fibroblastos bovinos primarios (24 hpm) y posteriormente activados (42 hpm). Los resultados representan cinco experimentos separados. Los ovocitos se dividieron en dos grupos, el grupo A se incubó en nocodazol durante 1 hora antes de la activación y durante 6 horas después de la activación. El grupo B no se trató con nocodazol. Los ovocitos activados se fijaron y se tiñeron con aceto-orceína 12 horas después de activación. Después se anotó el número de pronúcleos (NP) en cada partenote mediante contraste de fase. Los resultados se expresan como el porcentaje de ovocitos activados que contienen 1 o más pronúcleos.

TABLA 2

	TOTAL	NP 1	NP 2	NP 3	NP 4	NP > 4
GRUPO A	52	100	0	0	0	0
GRUPO B	33	45,2	25,8	16,1	3,2	9,7

La ausencia de un huso organizado y la ausencia de un cuerpo polar sugieren que con el fin de mantener la ploidía en el embrión reconstruido sólo se debería transferir un núcleo diploide, es decir G0/G1, en esta situación citoplasmática. La incubación de ovocitos activados en presencia del inhibidor de microtúbulos nocodazol durante 5 horas, 1 hora antes de y después del estímulo de activación previene la formación de micronúcleos (Tabla 2), y así cuando el núcleo donante está en la fase G0/G1 del ciclo celular se mantiene la ploidía correcta del embrión reconstruido.

Resultados

Estos resultados muestran que:

i) estos ovocitos pueden ser enucleados a las 18 horas después del inicio de la maduración (Figura 1);

ii) los ovocitos enucleados se pueden fusionar con blastómeros/células donantes en manitol 0,3 M o sacarosa 0,27 M, alternativamente las células o núcleos donantes se pueden inyectar en medio sin calcio en ausencia de cualquier respuesta de activación;

ES 2 309 989 T3

iii) los embriones reconstruidos o los ovocitos pulsados enucleados se pueden cultivar en medio de maduración y no experimentan activación espontánea;

iv) se ve que el núcleo transferido experimenta rotura de la envuelta nuclear (REN) y condensación de cromosomas. No se observa huso meiótico/mitótico organizado independientemente de la etapa del ciclo celular del núcleo transferido;

v) dichas parejas manipuladas se activarán a las 30 horas y 42 horas con una frecuencia igual a los ovocitos testigo no manipulados;

vi) no se observa cuerpo polar después de la subsiguiente activación, independientemente de la etapa del ciclo celular del núcleo transferido;

vii) tras la subsiguiente activación se forman 1-5 micronúcleos por cigoto reconstruido (Tabla 2).

Reconstrucción de embriones bovinos usando el procedimiento "MAGIC"

En experimentos preliminares esta técnica se ha aplicado a la reconstrucción de embriones bovinos usando fibroblastos primarios sincronizados en la fase G0 del ciclo celular por privación de suero durante cinco días. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

La Tabla 3 muestra el desarrollo de embriones bovinos reconstruidos por transferencia nuclear de fibroblastos primarios bovinos (G0) privados de suero a ovocitos MII inactivados enucleados. Los embriones se reconstruyeron 24 hpm y las parejas fusionadas se activaron a las 42 hpm. Las parejas fusionadas se incubaron en nocodazol (5 µg/ml) en medio M2 durante 1 hora antes de la activación y 5 horas después de la activación. Las parejas se activaron con un solo pulso DC de 1,25 kV/cm durante 80 µs.

TABLA 3

NÚMERO DE EXPERIMENTO	NÚMERO DE BLASTOCITOS/NÚMERO TOTAL DE PAREJAS FUSIONADAS	% DE BLASTOCITOS
1	1/30	3,3
2	4/31	12,9

Ejemplo 2

Procedimiento "MAGIC" usando ovocitos ovinos

También se han hecho observaciones similares a las del Ejemplo 1 en ovocitos ovinos que se han hecho madurar *in vivo*. Se pueden recoger ovocitos recién ovulados por barrido de los oviductos de ovejas superestimuladas 24 horas después de tratamiento con prostaglandina. El uso de PBS/FCS al 1,0% sin calcio ni magnesio como medio de barrido evita la activación del ovocito. Los ovocitos se pueden enuclear en medio sin calcio y las células donantes se introducen como antes en ausencia de activación. No se observa huso organizado, se forman múltiples núcleos tras la subsiguiente activación y esto se puede suprimir mediante tratamiento con nocodazol.

Resultados

En experimentos preliminares en ovejas, una sola gestación ha dado como resultado el nacimiento de un solo cordero vivo. Los resultados se resumen en las Tablas 4 y 5.

La Tabla 4 muestra el desarrollo de embriones ovinos reconstruidos por transferencia de una línea celular establecida derivada de embrión a ovocitos ovinos madurados *in vivo* enucleados e inactivados. Los ovocitos se obtuvieron de ovejas caranegra escocesas superestimuladas, la línea celular se estableció a partir del disco embrionario de un embrión de 9 días obtenido de una oveja galesa de montaña. Los embriones reconstruidos se cultivaron en el oviducto ligado de una oveja receptora temporal durante 6 días, se recuperaron y se evaluó el desarrollo.

ES 2 309 989 T3

TABLA 4

FECHA DE TRANSFERENCIA NUCLEAR	NÚMERO DE PASOS	NÚMERO DE MÓRULAS, BLASTOCITOS / NÚMERO TOTAL
17-1-95	6	4/28
19-1-95	7	1/10
31-1-95	13	0/2
2-2-95	13	0/14
7-2-95	11	1/9
9-2-95	11	1/2
14-2-95	12	
16-2-95	13	3/13
TOTAL		10/78 (12,8%)

La Tabla 5 muestra la inducción de preñez después de transferencia de todos los embriones reconstruidos en etapa de mórula/blastocito a la trompa uterina de ovejas caranegra receptoras finales sincronizadas. La tabla muestra el número total de embriones para cada grupo transferido y la frecuencia de preñez en términos de ovejas y embriones, en la mayoría de los casos se transfirieron 2 embriones a cada oveja. Se estableció una sola gestación doble que dio como resultado el nacimiento de un solo cordero vivo.

TABLA 5

NÚMERO DE PASOS	"MAGIC"
P6	4
P7	1
P11	2
P12	0
P13	3
MOR/BL TOTALES	10
NÚMERO TOTAL DE OVEJAS	6
OVEJAS GESTANTES %	1 (16,7)
FETOS/TRANSFERIDOS TOTAL (%)	2/10 (20,0)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reconstituir un embrión de mamífero no humano, comprendiendo el procedimiento transferir un núcleo diploide diferenciado no humano a un ovocito enucleado no humano que está detenido en la metafase de la segunda división meiótica sin activación simultánea del ovocito, mantener el núcleo no humano expuesto al citoplasma del receptor no humano durante un periodo de tiempo suficiente para que el embrión no humano sea capaz de dar lugar un nacido vivo, y posteriormente activar el embrión reconstituido mientras que se mantiene la ploidía correcta.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, en el que el mamífero no humano es una especie ungulada.
3. Un método según la reivindicación 2, en el que el mamífero no humano es una vaca o toro, cerdo, cabra, oveja o caballo.
- 15 4. Un método según la reivindicación 1, en el que el mamífero no humano es una especie roedora.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que el roedor es una rata o un ratón.
- 20 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula diferenciada se obtiene *ex vivo* o de un cultivo *in vitro*.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el núcleo donante está genéticamente modificado.
- 25 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el núcleo diploide es donado por una célula quiescente.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la transferencia nuclear se logra por fusión celular.
- 30 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el mamífero no humano es una vaca o toro, y en el que el núcleo donante se mantiene expuesto al citoplasma receptor durante un periodo de tiempo de 6 a 20 horas antes de la activación.
- 35 11. Un método para preparar un mamífero no humano, comprendiendo el método:
- (a) reconstituir un embrión de mamífero no humano según cualquiera de las reivindicaciones precedentes;
- (b) hacer que se desarrolle un mamífero no humano hasta el final a partir del embrión; y
- 40 (c) opcionalmente, reproducción a partir del mamífero no humano así formado.

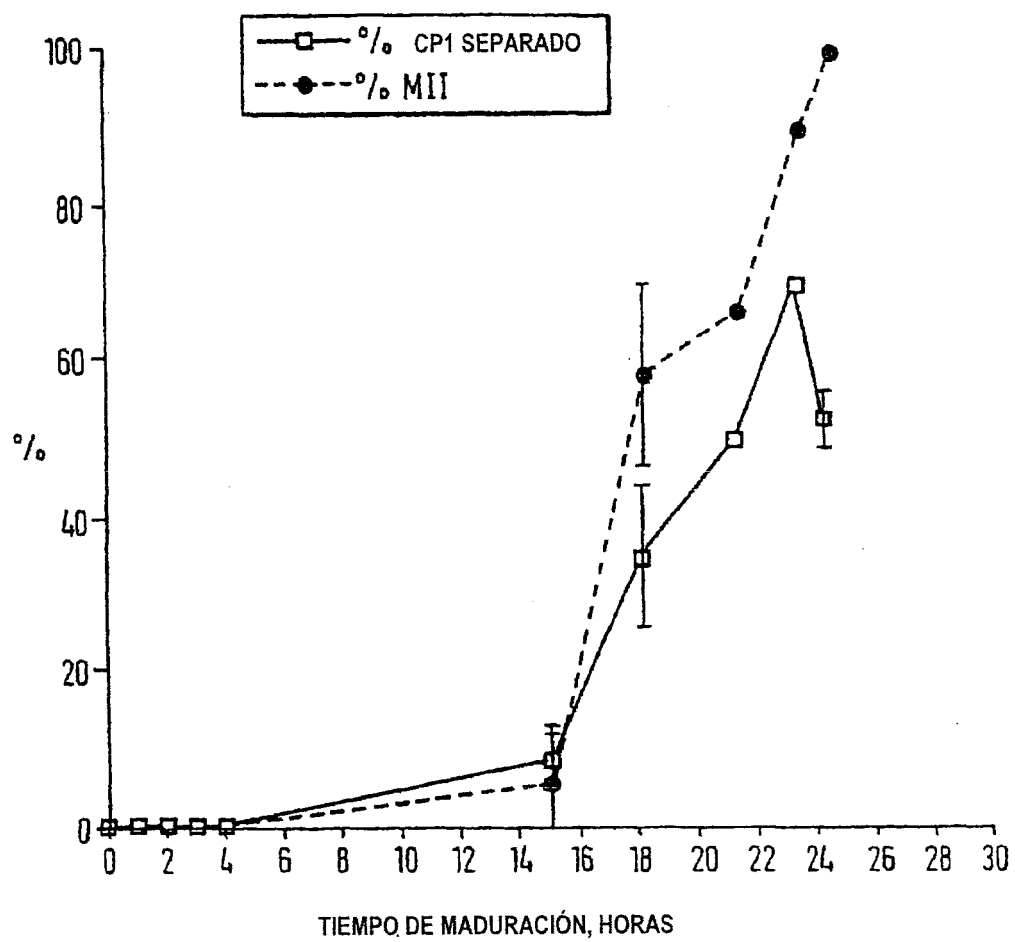


FIG. 1