



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 338 631**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/90** (2006.01)

**C12N 15/88** (2006.01)

**C12N 5/06** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00907792 .6**

(96) Fecha de presentación : **03.03.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1159415**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2001**

(54) Título: **Modificación genética de células somáticas y usos de las mismas.**

(30) Prioridad: **04.03.1999 GB 9905033**  
**20.07.1999 GB 9917023**  
**30.12.1999 US 475674**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.05.2010**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.05.2010**

(73) Titular/es: **REVIVICOR, Inc.**  
**1700 Kraft Drive, Suite 2400**  
**Blacksburg, Virginia 24060, US**

(72) Inventor/es: **Colman, Alan;**  
**Schnieke, Angelika Elisabeth;**  
**Kind, Alexander Jarvis;**  
**Ayares, David Lee y**  
**Dai, Yifan**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Modificación genética de células somáticas y usos de las mismas.

5 La presente invención describe la producción de animales modificados genéticamente en los que las modificaciones genéticas están diseñadas en células somáticas cultivadas *in vitro* usando la técnica de modificación génica dirigida. Las células modificadas genéticamente después se usan como donantes nucleares para producir *inter ali*, animales vivos.

10 Los procedimientos descritos también pueden usarse para validar loci en cromosomas animales que son sitios adecuados para adición de transgenes a las células. El procedimiento es particularmente útil para células en las que es necesario que no tengan efectos perjudiciales imprevistos, tales como células destinadas a transplante autólogo.

15 La técnica de transferencia nuclear permite la producción de descendencia por la reconstrucción de un embrión temprano. El material genético de una célula donante o carioplasto se transfiere a una célula receptora adecuada de la que se ha eliminado el material genético nuclear o genómico. En las primeras demostraciones de esta técnica, se obtuvo un desarrollo satisfactorio solamente cuando el material genético donante se tomaba de blastómeros de embriones tempranos. Posteriormente, se ha obtenido el desarrollo usando material genético donante de células diferenciadas mantenidas en cultivo y aisladas de tejidos embrionarios (Campbell y *col.*, Nature 380, 64-66, 1996), fetales y adultos (Wilmot y *col.*, Nature 385, 810-813, 1997); estos informes forman la base de las solicitudes de patente WO 97/07669 y WO 97/07668 que se incorporan en la presente solicitud en su totalidad, incluyendo todas las tablas y diagramas.

20 Los procedimientos para la transferencia nuclear también se han descrito en las solicitudes de patente publicadas WO 98/39416, WO 98/30683, WO 98/07841, WO 97/37009, WO 98/27214, WO 99/01163 y WO 99/01164.

25 Se ha obtenido descendencia viva en ratones usando poblaciones de células quiescentes obtenidas directamente *ex vivo* como donantes nucleares (Wakayama y *col.*, Nature 394, 369-373 1998). El uso satisfactorio de células diferenciadas también se ha demostrado en ovejas (Wilmot y *col.*, Nature 385, 810-813, 1997), ganado vacuno (Kato y *col.*, Science 282, 2095-2098, 1998; Wells, y *col.*, Theriogenology 1, 217, 1999; Zakhartchenko, y *col.*, Theriogenology 1, 218, 1999; Vignon, y *col.*, Theriogenology 1, 216, 1999) y ratones (Wakayama y *col.*, Nature 394, 369-373).

30 En todas las referencias citadas anteriormente, la célula donante nuclear y la receptora se toman de la misma especie. Sin embargo, se ha informado de éxito en la consecución del desarrollo de embriones reconstruidos usando células nucleares donantes y receptoras de diferentes especies (Dominko, y *col.*, Theriogenology 49, 385, 1998; Mitalipova, y *col.*, Theriogenology 49, 389, 1998).

35 El uso de la tecnología de transferencia nuclear tiene muchos beneficios y usos demostrados y potenciales en la producción de embriones, fetos y descendencia de mamíferos. Estos incluyen, entre otros;

40 1. La capacidad para modificar genéticamente células cultivadas que se van a usar como donantes nucleares antes de la reconstrucción del embrión.

45 2. La capacidad para realizar múltiples modificaciones genéticas en un único animal mediante modificaciones genéticas múltiples de una población celular en cultivo o mediante modificación genética, transferencia nuclear y re-aislamiento secuencial de una población celular del embrión, feto o animal producido de este modo.

3. La capacidad para aumentar la vida de poblaciones celulares cultivadas que se van a usar para modificación genética mediante transferencia nuclear y re-aislamiento de una población celular del embrión, feto o animal adulto producido de este modo.

50 4. La capacidad para producir múltiples copias de un animal a partir de una población celular modificada genéticamente, seleccionada y clonada.

55 5. La capacidad para producir múltiples copias de cualquier embrión, feto o animal adulto por transferencia nuclear desde células tomadas directamente *ex vivo*, o poblaciones celulares obtenidas de cualquier tejido tomado de cualquiera de estas fases con o sin cultivo *in vitro*.

60 6. La capacidad para producir verdaderos clones (que no solo comparten la identidad genética nuclear, sino también la identidad genética mitocondrial) utilizando ovocitos de la línea materna del donante celular como receptores de citoplastos para la reconstrucción de embriones.

7. La capacidad para almacenar genomas intactos durante largos periodos (por ejemplo, congelando poblaciones celulares en N<sub>2</sub> líquido) y de usar estas células almacenadas posteriormente para la producción de descendencia por transferencia nuclear.

65 8. La capacidad para desdiferenciar núcleos somáticos y de producir células no diferenciadas que pueden usarse para producir embriones, fetos y animales adultos quiméricos por agregación del embrión, o inyección. Esto también puede usarse para producir poblaciones de células madre embrionarias o células germinales embrionarias.

9. La capacidad para desdiferenciar cualquier tipo de célula somática por transferencia nuclear y de aislar del embrión producido de este modo, células madre embrionarias, o cualquier otro tipo celular especializado o no especializado deseado, por ejemplo, neuronas.

- 5 10. La posibilidad de conseguir cualquiera de los objetivos indicados en 1-9, usando células nucleares donantes y receptoras de diferentes especies.

10 Este proceso puede acoplarse con las técnicas de manipulación genética para la producción de descendencia transgénica (Schnieke y *col.*, Science 278, 2130-2133, 1997). El uso de transferencia nuclear acoplada a la modificación genética de células en cultivo y su selección antes de la producción del animal tiene varias ventajas demostradas, incluyendo;

15 1. Producción de animales no mosaico que aseguran la transmisión por la línea germinal de la(s) modificación(es) genética(s) (Schnieke y *col.*, *Supra*).

2. Una eficacia aumentada en la producción de dichos animales modificados genéticamente (Schnieke y *col.*, *Supra*).

20 3. La producción de múltiples copias de la descendencia reduciendo de este modo el intervalo de generación para producir rebaños o manadas de animales comercialmente importantes o aumento la cantidad de animales para la diseminación de la modificación genética en la población como conjunto (Cibelli, y *col.*, Nat. Biotechnol. 16, 642-6, 1998).

25 La tecnología de transferencia nuclear existente y publicada acoplada con la modificación genética de células en cultivo proporciona animales que contienen modificaciones genéticas sencillas y múltiples en los que los transgenes se incorporan en localizaciones no seleccionadas dentro del genoma hospedador. Sin embargo, la producción de células cultivadas que incorporan una modificación genética deseada diseñada en una localización precisa y predeterminada en el genoma hospedador (modificación genética dirigida) solamente se ha descrito previamente en la técnica para ratones usando células ES y los procedimientos publicados no implican tecnología de transferencia nuclear. No existen dichos procedimientos equivalentes para otros mamíferos. Dichas modificaciones tendrían varias ventajas cuando se aplican a una diversidad de especies animales incluyendo ganado vacuno, ovejas, cabras, caballos, camellos, conejos y roedores. Dichas ventajas incluyen, aunque sin limitación:

35 1. La producción de animales transgénicos con características superiores de expresión de transgenes colocando el transgén en un sitio predeterminado.

40 2. La eliminación, modificación, inactivación o reemplazo de un gen o genes endógenos elegidos y/o sus secuencias de control.

45 3. Si se descubre que dichas modificaciones no tienen efecto prejudicial imprevisto sobre el animal resultante que pudieran atribuirse a, por ejemplo, la alteración de genes endógenos, la activación de oncogenes, etc., esto constituiría la validación del locus elegido como sitio preferido para modificación genética, particularmente si el sitio también confería buena expresión de los transgenes colocados en el locus.

50 Un objetivo de esta memoria descriptiva de patente es rectificar esta situación y describir por primera vez procedimientos que puedan utilizarse para producir dichas células modificadas que después puedan usarse opcionalmente para producir, *inter ali*, animales completos por transferencia nuclear. Estos procedimientos (y otros) también pueden usarse para identificar loci cromosómicos específicos como dianas preferidas para la adición de transgenes como parte del proceso de terapia génica *ex vivo*.

55 La presente invención proporciona, de acuerdo con un primer aspecto, un procedimiento de transferencia nuclear que comprende: (a) preparar una célula somática no humana para transferencia nuclear por un procedimiento que comprende modificar el material genético de célula somática no humana por un acontecimiento de modificación genética dirigida en un locus endógeno; y (b) transferir el material genético desde la célula somática no humana a una célula receptora no humana. Preferiblemente, la célula somática no humana es una célula somática primaria. Preferiblemente, la célula somática es una célula somática de animal vertebrado. Preferiblemente, la célula no es una célula inmortalizada. Tradicionalmente, las células pueden definirse como "somáticas", o "de la línea germinal". Algunas células, por ejemplo, las células ES, pueden no coincidir fácilmente en ninguna de estas dos categorías tradicionales porque se obtienen de embriones antes de que puedan distinguirse los distintos linajes somático y germinal. Su equivalente funcional, las células EG (germinales embrionarias) se definen más fácilmente como células "de la línea germinal" porque se obtienen de células germinales primordiales. En el presente texto, el término "somática" no cubre células ES o EG.

El uso de este procedimiento no está restringido a un tipo celular donante particular. Las células adecuadas incluyen células somáticas embrionarias, fetales y adultas (de cariotipo normal). En este texto una célula "adulto" o un animal

“adulto” es una célula o animal que ha nacido. Por tanto, un animal y sus células se consideran “adultos” desde el nacimiento. Dichos animales adultos, de hecho, cubren animales desde el nacimiento en adelante, y por tanto incluyen “recién nacidos” y “juveniles”. La invención incluye el uso de células no diferenciadas, por ejemplo, células madre somáticas tales como células madre hematopoyéticas, células al menos parcialmente diferenciadas y células completamente diferenciadas. Ejemplos de células parcialmente diferenciadas incluyen células de linaje embrionario o células precursoras (por ejemplo, células precursoras neurales).

Células somáticas adecuadas de acuerdo con el primer aspecto de la invención están preferiblemente, aunque no necesariamente, en cultivo. Las células somáticas adecuadas incluyen fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, células neurales, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), eritrocitos de ave, macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardíaco, otras células musculares, células de la granulosa, células del cumulus y células epidérmicas. Las células para el procedimiento del primer aspecto de la invención pueden obtenerse de una diversidad de diferentes órganos tales como piel, mesénquima, pulmón, páncreas, corazón, intestino, estómago, vejiga, vasos sanguíneos principales, riñón, uretra, órganos reproductores etc. o una preparación disgregada de un feto o embrión completo o partes del mismo.

Las células adecuadas pueden obtenerse o derivarse de cualquier animal no humano, incluyendo pájaros tales como aves de corral domésticas, especies de anfibios y especies de peces. En la práctica, sin embargo, son los mamíferos los animales que contemplan la mayor ventaja comercial. Un animal preferido del que se obtiene la célula somática es un ungulado, seleccionado entre un bóvido, óvido, cérvido, suido, équido o camélido. En particular, el ungulado es una vaca o toro, oveja, cabra, bisonte, búfalo asiático o cerdo. También se contemplan por la presente invención células somáticas obtenidas o derivadas de un caballo, camello, roedor (por ejemplo, rata, ratones) o un lagomorfo (por ejemplo, conejo).

Las fuentes adecuadas para células receptoras no humanas en el proceso de transferencia nuclear no son limitantes. La célula receptora es preferiblemente un ovocito no humano, un cigoto fertilizado no humano o un embrión de dos células no humano, todos los cuales se han enucleado.

El acontecimiento de modificación genética dirigida puede ser cualquier que posibilite la modificación del material genético de la célula somática en un sitio predeterminado. Dicho acontecimiento de modificación genética dirigida incluye inactivación, eliminación o modificación del material genético: regulación positiva de la función del material genético; reemplazo del material genético; e introducción de material genético. El material genético en particular comprende un gen o una parte del mismo o una región que influye en la expresión de un gen o genes. Por consiguiente, los acontecimientos de modificación genética dirigida pueden incluir inactivación, eliminación o modificación de un gen, regulación positiva de un gen, reemplazo génico o reemplazo transgénico en un locus predeterminado.

Preferiblemente, el acontecimiento de modificación genética dirigida sucede por recombinación homóloga.

Preferiblemente, la derivación de clones celulares con modificación génica dirigida sucede a elevada eficacia. De acuerdo con este aspecto de la invención, elevada eficacia se define como una proporción de clones celulares con modificación génica dirigida:transfectados aleatoriamente dentro de la misma población celular seleccionada que es igual a o mayor de 1:100.

Los detalles precisos de modificación genética dirigida pueden variarse para mejorar la eficacia. De acuerdo con la diversidad de modificaciones, la modificación genética dirigida de una célula somática adecuada para transferencia nuclear puede diseñarse para maximizar la frecuencia de modificación dirigida homóloga. Un factor que puede usarse para aumentar la modificación genética dirigida por recombinación homóloga es el efecto de la transcripción sobre el material genético diana. Preferiblemente, la diana genética se transcribe activamente o está adyacente a un locus genético que se transcribe activamente. Dichas dianas genéticas o loci pueden identificarse dependiendo del tipo de célula somática usada, y también posiblemente de la fase de dicha célula. Dichos genes pueden identificarse en base a la abundancia de las moléculas de ARNm correspondientes. Los genes adecuados producirían ARNm que están en la clase intermedia definida arbitrariamente, o en la clase abundante de ARNm que están presentes a 300 o más copias de cada molécula por célula (Alberts y *col.* 1994, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Nueva York y Londres). Un ejemplo de una diana génica adecuada en fibroblastos es cualquier gen o locus que codifique colágeno, en particular los loci de los genes COL1A1 o COL1A2. Sin embargo, muchos loci adecuados están presentes en un material genético celular, tal como los genes de la proteína de la leche, por ejemplo, en células epiteliales mamarias; inmunoglobulinas en linfocitos; HSA y transferrina en células hepáticas; y colágeno tipo VII en queratinocitos.

De acuerdo con este aspecto de la invención, pueden usarse medios eficaces de transfección que maximizan la cantidad de clones celulares derivados que han experimentado un acontecimiento de modificación génica dirigida. Por ejemplo, pueden usarse reactivos de transfección mediada por lípidos por ejemplo “LipofectaAMINA” (Gibco/Life Sciences) o “GenePorter” (Gene Therapy Systems).

Como alternativa, o adicionalmente, pueden incluirse largas regiones de homología al locus diana en el vector de modificación génica dirigida. La longitud total de homología presente en el vector de modificación dirigida es preferiblemente mayor de 7 kb.

Como alternativa, o adicionalmente, puede usarse ADN de un vector de modificación génica dirigida no lineal, es decir, ADN que no se ha linealizado por escisión con enzimas de restricción. En esta realización de la invención, el ADN introducido por transfección está predominantemente en una forma circular, que puede estar sustancialmente superenrollado o sustancialmente relajado.

Las características anteriores de los procedimientos de transfección pueden usarse solos o en combinación entre sí.

Una estrategia particularmente útil para aumentar la modificación genética dirigida es la inducción artificial de expresión génica o la inducción de cambios en la cromatina en un tipo de célula somática. Preferiblemente, el acontecimiento de modificación genética dirigida se facilita por un agente que inhibe la desacetilación de histonas o por un factor que estimula la transcripción en el locus diana. El factor puede expresarse en la célula hospedadora. Esta estrategia se describe con más detalle en el resto de este texto.

De acuerdo con la modificación genética dirigida de la presente invención, puede ser útil o necesario, en algún punto después del acontecimiento y preferiblemente antes de cualquier transferencia nuclear, retirar partes del material genético de la célula. Dicho material puede ser un marcador de selección, o por ejemplo, un activador de la transcripción genética introducido. Dicha eliminación puede realizarse por procedimientos descritos a continuación, o por otros procedimientos bien conocidos en la técnica.

La preparación de la célula somática (por modificación del material genético de la célula) puede ser una etapa precedente a la transferencia nuclear. La presente invención proporciona, por primera vez, un procedimiento por el que una célula somática puede modificarse genéticamente y que también apoya la transferencia nuclear satisfactoria. El apoyo de la transferencia nuclear satisfactoria requiere que el embrión reconstituido avance para producir un animal viable nacido vivo, o un embrión o feto que pueda usarse como fuente de tejido, incluyendo células EG y células ES.

El procedimiento de transferencia nuclear para la presente invención no está limitado. Puede usarse cualquier procedimiento de transferencia nuclear. La transferencia nuclear puede incluir material genético de una especie animal o un tipo de animal a una célula receptora de la misma o diferente especie o tipo de animal.

Las células receptoras pueden ser cualquier célula receptora adecuada para cualquier procedimiento de transferencia nuclear, incluyendo un ovocito, un cigoto fertilizado o un embrión de dos células que se ha enucleado.

La transferencia del material genético de una célula somática a una célula receptora proporciona un embrión animal (el embrión animal comprende el resultado de la transferencia nuclear de la célula única a través de todas y cada una de las fases multi-celulares).

El procedimiento de la invención también puede comprender la producción de células totipotentes o pluripotentes clonadas de un embrión o feto obtenido por transferencia nuclear. Los procedimientos para la obtención de células totipotentes o pluripotentes, tales como células madre, de embriones (células ES y células tipo ES) y de células germinales primordiales de embriones y fetos de fases posteriores (células EG) se han descrito por muchos autores que se citan posteriormente en este texto. Las células madre pluripotentes son particularmente útiles para la producción de células diferenciadas y sus precursores *in vitro* que pueden proporcionar una fuente de células para trasplante (preferiblemente para seres humanos).

Las células (incluyendo células somáticas) obtenidas de embriones o fetos (o adultos) también pueden usarse para rondas adicionales de transferencia nuclear. La reobtención de células de un embrión o feto producido por transferencia nuclear puede facilitar manipulaciones genéticas múltiples o secuenciales que de otro modo no son posibles en las células primarias iniciales.

Como alternativa, el procedimiento para obtener un embrión animal de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente causar que un animal se desarrolle a término a partir del embrión. En dicho procedimiento, el embrión animal se desarrolla preferiblemente a término *in vivo*. Si el desarrollo hasta blastocisto ha tenido lugar *in vitro*, después la transferencia en un animal sustituto tiene lugar en este estado. Si el desarrollo del blastocisto ha tenido lugar *in vivo*, aunque en principio el blastocisto puede dejarse desarrollar a término en el hospedador pre-blastocisto, en la práctica el blastocisto habitualmente se moverá desde el receptor pre-blastocisto temporal y, después de la disección del medio protector, se transferirá al receptor post-blastocisto permanente. El desarrollo a partir del embrión hasta un adulto progresa a través de la fase de un feto.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un embrión o feto transgénico obtenido por un procedimiento de acuerdo con la invención. Las características preferidas del aspecto uno solamente se aplican al segundo aspecto.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un procedimiento para preparar un animal transgénico que comprende causar que un animal no humano se desarrolle a término a partir de un embrión o feto no humano de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. Opcionalmente, el animal no humano transgénico del tercer aspecto puede reproducirse y dicha descendencia (incluyendo embriones, fetos y adultos) también está incluida por la presente invención. Las características preferidas de los aspectos uno y dos solamente se aplican al tercer aspecto.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un animal transgénico, o descendencia del mismo, de acuerdo con el tercer aspecto de la invención. Las características preferidas de los aspectos uno a tres solamente se aplican al cuarto aspecto.

Los procedimientos de transferencia nuclear de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, un procedimiento de transferencia nuclear doble. Dicho procedimiento, así como los detalles de los procedimientos de transferencia nuclear de una única etapa, se describen en el documento WO 0042174 y se describen a continuación.

La invención no se refiere a la clonación reproductora humana. Por tanto, la “célula receptora”, “población celular totipotente”, “embrión transgénico”, “célula transgénica”, “célula somática” y “embrión animal” usados con la invención no incluyen células o embriones humanos.

En general, los ovocitos detenidos en la metafase de la segunda división meiótica se han usado como receptores de citoplasto. El material genético donante se ha introducido en el citoplasma celular receptor por los procesos de 1) fusión celular 2) inyección de células intacta, células lisadas o núcleos. La transferencia de material genético puede suceder en el momento de la activación, precedente a la activación (véanse las solicitudes de patente WO 97/07669 y WO 97/07668) o después de la activación (Campbell y col., Biol. Reprod. 49 9330942 (1993); Campbell y col., Biol. Reprod. 50 1385-1393 (1994)). En cada uno de estos casos, la ploidía del embrión reconstruido debe mantenerse por el uso de material genético donante en una fase apropiada del ciclo celular (para una revisión véase Campbell y col., Reviews of Reproduction 1:40-46 (1996)). Este proceso puede acoplarse con técnicas de manipulación genética para la producción de descendencia transgénica (Schnieke y col., Science 278:2130-2133 (1997)). El uso de transferencia nuclear acoplada a modificación genética de células en cultivo y su selección antes de la producción del animal tiene varias ventajas como se ha descrito anteriormente.

En cerdos, el uso de transferencia nuclear para la producción de descendencia viva se ha asociado con dificultades. Aunque la descendencia se ha producido intercambiando los pronúcleos de cigotos fertilizados, solamente se ha producido 1 lechón a partir de una fase de desarrollo posterior (4 células) (Prather y col., Biol Reprod 1989 Sep 41:3 414-8).

El proceso de reconstrucción de embriones y producción de descendencia viable por transferencia nuclear es un procedimiento de múltiples etapas. Cada una de estas etapas se describirá ahora con más detalle. La siguiente descripción pretende dar una explicación de las etapas y no es una descripción exhaustiva ni limitante.

### *La Célula Receptora o Citoplasto*

Se han usado ovocitos, cigotos fertilizados y embriones de dos células como receptores de citoplasto para la transferencia nuclear. En general, los ovocitos detenidos en metafase de la segunda división meiótica (también llamados óvulos sin fertilizar) se han convertido en el citoplasto de elección. En este punto en el desarrollo del ovocito, el material genético se ordena sobre el huso meiótico y se elimina fácilmente usando medios mecánicos. Varios informes han demostrado que durante la maduración, es decir, entre la fase de vesícula germinal (profase de la primera división meiótica) y la detención en la metafase de la segunda división meiótica, el ADN genómico puede eliminarse y el citoplasto resultante usarse para transferencia nuclear (Kato Y., Tsunoda Y., Mol Reprod Dev (1993) Oct 36:2 276-8). Se ha informado del uso de cigotos fertilizados como receptores de citoplasto en ratones (Kwon O.Y., Kono T., Proc Natl Acad Sci U.S.A (1996) Nov 12, 93:23 13010-3), ganado vacuno (Prather R.S., First N.L., J Reprod Fertil Suppl (1990) 41), y cerdos (Prather y col., Biol Reprod (1989) Sep 41:3, 414-8). En ganado vacuno y cerdos, el desarrollo de embriones reconstruidos usando cigotos como receptores de citoplasto es bajo y globalmente restringido al intercambio de pronúcleos, lo que sugiere que factores esenciales para el desarrollo satisfactorio se eliminan con los pronúcleos. El procedimiento de transferencia nuclear doble produce una estructura tipo pronúcleo (incluyendo un pronúcleo) por transferencia de un núcleo adecuado, preferiblemente a un ovocito en Metafase II enucleado. La estructura tipo pronúcleo formada de este modo contendrá factores, que generalmente se eliminan durante la enucleación del cigoto. Esta estructura tipo pronúcleo después se usa como donante de material genético para la reconstrucción de embriones por una segunda transferencia nuclear. Pueden usarse núcleos o células de cualquier fase del ciclo celular como donantes de material genético preferiblemente, sin embargo, la fase del ciclo celular del citoplasto receptor debe controlarse en consecuencia.

### *Preparación de un Receptor de Citoplasto por Eliminación del Material Genético Genómico*

Este proceso se ha llamado en general enucleación. En la mayoría de los receptores utilizados, el ADN genómico no está encerrado dentro de una membrana nuclear en el momento de la eliminación. La eliminación del material genético de acuerdo con la presente invención y descrita por el término “enucleación” no requiere que el material genético esté presente en una membrana nuclear (puede estar o no estar, o puede estar parcialmente). La enucleación puede conseguirse físicamente por la eliminación real del núcleo, los pronúcleos o la placa metafásica (dependiendo de la célula receptora), o funcionalmente, tal como por la aplicación de radiación ultra-violeta u otra influencia de enucleación. La eliminación del material genético es posible por medios físicos y/o químicos. En los primeros informes de transferencia nuclear, los ovocitos MII simplemente se cortaban por la mitad en base a que una mitad contendría el material genético y la otra no. Se han hecho modificaciones a este enfoque para reducir el volumen de citoplasma,

que se había eliminado. Esto puede conseguirse por aspiración de una pequeña cantidad de citoplasma de debajo directamente del primer cuerpo polar usando micropipetas de vidrio o usando una cuchilla para cortar la parte del ovocito por debajo del cuerpo polar. Para facilitar la plasticidad del ovocito éste puede pre-tratarse con el inhibidor de microtúbulos citocalasina B u otro de dichos agentes que alteran el citoesqueleto. En contraste con la enucleación física, el tratamiento químico ha demostrado que produce la eliminación completa del material genético en ratones.

El tratamiento de ovocitos en maduración con el inhibidor de topoisomerasa etopósido provoca la expulsión de todos el material genómico con el primer cuerpo polar (Elsheikh A.S. y col. Jpn J Vet Res (1998) Feb 45:4, 217-20), sin embargo no se ha descrito desarrollo a término usando receptores de citoplasma producidos por este procedimiento y no hay informes de este procedimiento en otras especies. Se ha informado de que la centrifugación de ovocitos MII combinada con tratamiento con citocalasina B causa enucleación en ovocitos de hámster y ganado vacuno (Tatham y col., Hum Reprod (1996) Jul 11:7 1499-503). Se ha informado el desarrollo de embriones reconstruidos a partir de dichos citoplastos en ganado vacuno, sin embargo, la frecuencia de desarrollo es baja.

Cuando se usan cigotos, el material genético puede eliminarse por aspiración mecánica de ambos pronúcleos. En función de la especie, para facilitar la visualización de los pronúcleos pueden centrifugarse los cigotos antes de la enucleación.

#### *Introducción de material genético (reconstrucción de embriones)*

Con una célula o citoplasma receptor adecuado preparado se introducirá el material genético donante. Se ha informado de diversas técnicas, incluidas;

1. Fusión celular inducida por medios químicos, virales o eléctricos.

2. Inyección de una célula intacta por cualquier procedimiento.

3. Inyección de una célula lisada o dañada.

4. Inyección de un núcleo.

Cualquiera de estos procedimientos puede usarse en cualquier especie con algunas modificaciones de protocolos individuales.

#### *Activación del embrión reconstruido*

Además de la transferencia del material genético donante del carioplasma al citoplasma, el citoplasma debe estimularse para que inicie el desarrollo. Cuando se usa un cigoto fertilizado como receptor de citoplasma, el desarrollo ya se ha iniciado mediante la entrada de espermatozoides en la fertilización. Cuando se usan ovocitos MII como receptores de citoplasma, el ovocito debe activarse mediante otros estímulos. Se ha informado que diversos tratamientos inducen la activación del ovocito y estimulan el desarrollo embrionario temprano entre los que se incluyen la aplicación de un estímulo eléctrico de CC, el tratamiento con etanol, ionomicina, inositol tri-fosfato (IP<sub>3</sub>), ionóforo de calcio A23187, el tratamiento con extractos de espermatozoides o cualquier otro tratamiento que induzca la entrada de calcio en el ovocito o libere los almacenes internos de calcio y provoque el inicio del desarrollo. Además, cualquiera de estos tratamientos, solos o en combinación, puede aplicarse, al mismo tiempo o en diferentes momentos, o en combinación con inhibidores de la síntesis de proteínas (es decir, cicloheximida o puromicina) o inhibidores de las proteína cinasas de serina y treonina (es decir 6-DMAP).

#### *Cultivo de embriones reconstruidos*

Los embriones reconstruidos por transferencia nuclear pueden cultivarse *in vitro* hasta una fase adecuada para la transferencia a un receptor final usando cualquier medio de cultivo adecuado o proceso de cultivo. Como alternativa, los embriones pueden cultivarse *in vivo* en el oviducto ligado de un animal hospedador adecuado (en general, ovejas) hasta que se alcance una fase adecuada para la transferencia a un receptor sustituto final. Los embriones de ganado vacuno, ovejas y otras especies pueden cultivarse en un receptor transespecie, por simplicidad una oveja proporciona un receptor adecuado para especies bovinas, ovinas y porcinas. Para evitar el daño mecánico o ataque por macrófagos a los embriones reconstruidos mientras están en el oviducto del receptor temporal, es habitual incluir los embriones en una capa protectora de agar o material similar.

Los sistemas de cultivo *in vitro* actualmente disponibles para embriones porcinos soportan el desarrollo hasta la fase de blastocisto, sin embargo, la frecuencia de nacimientos vivos a partir de dichos embriones es baja (Machaty y col., Biology of Reproduction, (1998) 59, 451-455). En el procedimiento de transferencia nuclear doble, el embrión reconstruido por la primera transferencia nuclear puede cultivarse por cualquiera de estos procedimientos hasta que suceda la formación un cuerpo tipo pronuclear y el embrión se usa para la segunda reconstrucción por transferencia nuclear. En la práctica, actualmente se prefiere que este primer periodo de cultivo se realice usando un medio adecuado *in vitro*.

Cada una de las etapas implicadas en la reconstrucción de embriones mamíferos por transferencia nuclear es ineficaz. En cerdos esto es particularmente evidente por la ausencia de informes sobre la producción de descendencia viva a partir de embriones reconstruidos por transferencia nuclear. La base de la transferencia nuclear doble es minimizar las etapas ineficaces implicadas en el proceso de reconstrucción usando un procedimiento de reconstrucción de embrión de múltiples etapas y cultivando los embriones en el receptor sustituto final. El procedimiento de transferencia nuclear doble proporciona un procedimiento para reconstruir un embrión animal. El proceso comprende transferir un núcleo en un primer ovocito seguido de la eliminación y transferencia de dicho núcleo de dicho ovocito a una célula receptora adicional. Preferiblemente, el núcleo transferido desde el primer ovocito está en forma de una estructura tipo pronúcleo. Preferiblemente, la segunda célula receptora es un ovocito o un cigoto fertilizado enucleado. Esto implica un procedimiento de transferencia nuclear doble. La primera etapa de este procedimiento es producir una estructura tipo pronúcleo por transferencia de un núcleo donante a un ovocito. Preferiblemente, el ovocito es un ovocito en metafase II maduro (óvulo no fertilizado), que se ha activado previamente o se activa simultánea o posteriormente, o un ovocito MII activado (la activación es habitualmente por introducción física o química). Un ejemplo de la primera etapa se muestra en la Figura 21 (por beneficios de simplicidad, el uso de un receptor activado en la Figura 21 no se muestra, pero esto está documentado en la siguiente Tabla 1). En la segunda etapa del procedimiento, la estructura tipo pronúcleo generada por la primera etapa se retira del primer embrión reconstruido y se transfiere a un ovocito o a un partenote activado o cigoto fertilizado enucleado (Figura 21). Cuando la transferencia es a un ovocito, preferiblemente la estructura tipo pronúcleo se retira del primer embrión reconstruido y se transfiere a un ovocito que es un ovocito MII enucleado antes de, de forma concomitante con o después de la activación. Después de la segunda transferencia nuclear, el embrión reconstruido puede transferirse directamente a un receptor sustituto final para el desarrollo a término.

(Tabla pasa a página siguiente)



## ES 2 338 631 T3

TABLA 1

*Posibles combinaciones del ciclo celular de las células donante y receptora para la primera TN para mantener la ploidía del(de los) núcleo(s) de los cigotos reconstruidos*

| FASE DEL CICLO DE LA CÉLULA DONANTE | CITOPLASTO RECEPTOR                                              | OTRO TRATAMIENTO                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| G0                                  | MII CONCOMITANTE con ACTIVACIÓN                                  |                                                                                                                                                                         |
| G0                                  | MII POST-ACTIVACIÓN                                              | MANTENIMIENTO QUÍMICO DE LA PLOIDÍA (es decir, nocodazol, colcemid, DMAP u otros inhibidores de serina-treonina cinasa).                                                |
| G0                                  | MII PRE-ACTIVACIÓN                                               |                                                                                                                                                                         |
| G1                                  | MII CONCOMITANTE con ACTIVACIÓN                                  |                                                                                                                                                                         |
| G1                                  | MII POST-ACTIVACIÓN                                              | MANTENIMIENTO QUÍMICO DE LA PLOIDÍA (es decir nocodazol, colcemid, DMAP, u otros inhibidores de serina-treonina cinasa).                                                |
| G1                                  | MII PRE-ACTIVACIÓN                                               |                                                                                                                                                                         |
| S                                   | PRE-ACTIVACIÓN                                                   |                                                                                                                                                                         |
| G2                                  | MII enucleado POST-ACTIVACIÓN                                    | PN tetraploide<br>Transferencia a cigoto de 1 célula en G2 tardía/mitótico                                                                                              |
| G2                                  | MII no enucleado POST-ACTIVACIÓN                                 | Enucleación posterior<br>*Supresión de la formación de PB si se requiere para formar 2 pronúcleos diploides                                                             |
| G2                                  | MII PRE-ACTIVACIÓN                                               |                                                                                                                                                                         |
| S                                   | MII PRE-ACTIVACIÓN                                               |                                                                                                                                                                         |
| M                                   | MII enucleado POST-ACTIVACIÓN                                    | Despolimerización del huso si se requiere, es decir, nocodazol para formar un único pronúcleo tetraploide.<br>Transferencia a cigoto de 1 célula en G2 tardía/mitótico. |
| M                                   | MII enucleado PRE-ACTIVACIÓN G2 TARDÍA (MPF creciente o elevado) |                                                                                                                                                                         |

|                            |                                      |                                                                                                                    |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M                          | MII enucleado POST-<br>ACTIVACIÓN    | PN tetraploide<br>Transferencia a cigoto de una célula en G2<br>tardía/mitótico.                                   |
| M                          | MII no enucleado POST-<br>ACTIVACIÓN | Enucleación posterior<br>*Supresión de la formación de PB si se<br>requiere para formar 2 pronúcleos<br>diploides. |
| *Dependiente de la especie |                                      |                                                                                                                    |

Cualquier célula diferenciada, parcialmente diferenciada o no diferenciada tomada directamente de cualquier fase en el desarrollo de un animal, tal como un embrión, feto, animal juvenil o adulto o cualquier línea celular derivada de los mismos puede proporcionar el material genético donante para la reconstrucción de embriones. En informes previos, la fase del ciclo celular del núcleo donante ha demostrado ser crítica para el desarrollo. En la presente invención, puede usarse una célula en cualquier fase del ciclo celular como donante de material genético para el primer proceso de reconstrucción. Sin embargo, la combinación de las fases del ciclo celular del núcleo donante y el citoplasma receptor variará dependiendo de la fase del ciclo celular de la célula a usar como donante de material genético en el momento de la transferencia. No se requiere que el material genético donante y las células receptoras, sean de la misma especie animal, aunque puede preferirse esto.

#### *Preparación de células donantes*

Los procedimientos y materiales para el cultivo, sincronización y selección de células donantes a usar como donantes nucleares para la reconstrucción de embriones por transferencia nuclear son bien conocidos para cualquier especialista en la técnica. Cualquier población celular obtenida directamente de cualquier fase en la vida de un animal (por ejemplo, embrión, feto o animal adulto) puede usarse como material genético donante, como alternativa puede usarse una célula de cualquier población (por ejemplo, un población de células no diferenciadas, parcialmente diferenciadas o diferenciadas) obtenida de cualquier fase (por ejemplo embrión, feto, animal juvenil o adulto) y mantenerse en cultivo o cualquier célula (por ejemplo, célula no diferenciada, parcialmente diferenciada o diferenciada) resultante durante el cultivo de aislados primarios o como resultado del tratamiento de la población celular cultivada con hormonas, factores de crecimiento o agentes químicos que alteran el estado diferenciado. La fase del ciclo celular de células mantenidas en cultivo puede manipularse para asegurar la coordinación con el citoplasma receptor usando cualquier medio disponible para cualquier especialista en la técnica. Los siguientes ejemplos son no limitantes y son simplemente representativos de diversos aspectos de la técnica.

#### Fase G0

Puede usarse cualquier procedimiento que provoque la producción de células diploides quiescentes (sin crecimiento) que han detenido el ciclo celular después de la mitosis y la división celular pero antes de la aparición replicación del ADN o fase S. Los procedimientos adecuados incluyen, entre otros;

I. Quiescencia inducida por inhibición por contacto de poblaciones celulares cultivadas

II. Quiescencia inducida por la eliminación o reducción en la concentración de suero u otro nutriente esencial en el medio de cultivo, es decir, leucina u otro aminoácido, factor(es) de crecimiento específico(s).

III. Quiescencia inducida por senescencia.

IV. Quiescencia inducida por la adición de un factor de crecimiento específico u otra sustancia.

V. Quiescencia inducida por cualquier medio físico tal como choque por calor, presión hiperbárica o tratamiento con compuestos químicos que inducen un choque por calor o respuesta de estrés, por ejemplo, puromicina, azacitidina.

#### Fase G1

Los núcleos donantes pueden detenerse en la fase G1 del ciclo celular por tratamiento con cualquier agente químico, hormona, factor de crecimiento u otra sustancia que cause la detención o por cualquier estrés físico que induzca la detención del ciclo celular, es decir, la inducción de una respuesta de choque por calor como resultado de elevada

temperatura o tratamiento con compuestos que inducen dicha respuesta, es decir, puromicina, azacitidina. Como alternativa, las células en fase G1 pueden obtenerse por sincronización de la población celular por cualquier medio y selección de células G1 en un momento apropiado. Por ejemplo, las células pueden detenerse en la fase M del ciclo celular mediante tratamiento con fármacos que alteran los microtúbulos tales como colcemid o nocodazol, después las células mitóticas pueden seleccionarse de la población por agitación y colocarse en un recipiente de cultivo diferente. Las células G1 después pueden seleccionarse en un momento apropiado después de la agitación. Como una variación de esta técnica, las células mitóticas también pueden seleccionarse de una población no sincronizada. Las células G1 pueden enriquecerse induciendo la salida de las células del ciclo celular y su detención en una fase quiescente o G0 (como en lo que antecede) y, después, re-estimulando el crecimiento mediante la nueva adición del factor de restricción. Las células G1 después pueden seleccionarse en un momento después de la re-estimulación para hallarse por experimentación para cada tipo/población celular individual. Esta técnica puede combinarse con cualquier técnica que después detenga las células en la fase G1 del ciclo celular, o en el límite fase G1/S, es decir, el tratamiento con hidroxiurea o afidicolina.

## 15 Fase S

Las células en fase S pueden seleccionarse o enriquecerse por tratamiento con cualquier agente químico que interfiera con cualquier punto del procedimiento de replicación, por ejemplo, afidicolina que inhibe la elongación de cadena de un modo dependiente de la concentración, hidroxiurea que inhibe la enzima ribonucleótido reductasa. Las células sincronizadas en cualquier otra fase del ciclo celular pueden liberarse y puede determinarse experimentalmente la coordinación de la fase S después de la liberación. Además, estos dos procesos pueden combinarse o utilizarse cualquier otro procedimiento de selección o sincronización o combinación de los mismos.

## 25 Fase G2

Las células en fase G2 pueden seleccionarse de una población en crecimiento que se ha sincronizado mediante cualquier procedimiento físico, químico o selectivo. Como alternativa, las células G2 pueden enriquecerse por tratamiento de una población celular sincronizada o no sincronizada con cualquier agente que detenga específicamente el ciclo celular después de completarse la fase S y antes de la aparición de la mitosis.

## Fase M

Las células mitóticas pueden seleccionarse de una población no sincronizada usando cualquier medio posible incluyendo, aunque sin limitación, agitación mitótica, elutriación, FACS (separación de células activadas por fluorescencia). Como alternativa, las células pueden detenerse en mitosis por tratamiento con agentes que alteran los microtúbulos tales como colcemid o nocodazol, por tratamiento con DMAP o cualquier otro inhibidor de proteína cinasas de serina y treonina o por cualquier otro medio químico o físico que altere el progreso normal de crecimiento y cause la detención en mitosis.

## *Poblaciones celulares no sincronizadas*

Las poblaciones celulares no sincronizadas pueden obtenerse de cualquier tejido embrionario, fetal o adulto y cultivarse *in vitro*, o puede extraerse cualquier célula directamente de un embrión, feto, animal juvenil o adulto. Una célula no sincronizada se define como una célula cuya fase del ciclo celular es desconocida en el momento de la transferencia a un citoplasto receptor.

## 50 *Transferencia nuclear*

### I) Ovocitos

Los ovocitos que van a actuar como receptores de citoplasto adecuados pueden obtenerse usando una diversidad de técnicas y protocolos, estos incluyen, entre otros,

i) Maduración *in vitro* después de la aspiración del folículo desde los ovarios obtenidos en el sacrificio o extraídos quirúrgicamente.

ii) Punción transvaginal del folículo seguida de maduración *in vitro*.

iii) Maduración *in vivo* aunque se recogen por punción transvaginal del folículo antes de la ovulación, después se completa la maduración *in vitro*.

iv) Maduración *in vivo* y recuperación quirúrgica.

v) Maduración *in vivo* y recuperación en el sacrificio.

Es preferible, pero no esencial, que todos los ovocitos madurados *in vivo* se recojan por lavado abundante desde el oviducto en solución salina tamponada con fosfato (PBS) libre de calcio y magnesio (u otro medio adecuado desprovisto de iones calcio y magnesio) que contiene suero bovino fetal (FCS) al 1,0%. Asimismo, los ovocitos madurados *in vitro* se recogen y transfieren a un medio adecuado desprovisto de iones calcio y magnesio (por ejemplo medio M2 preparado sin la adición de iones calcio y magnesio). El medio elegido puede suplementarse con FCS, BSA u otra fuente de proteínas. Los ovocitos se limpian de células del cumulus y se enuclean como se ha descrito previamente (Campbell y col., 1993, 1994) con la excepción de que se prefiere medio libre de calcio, aunque no el esencial para todos los procedimientos. Los procedimientos de fusión son modificaciones de los previamente presentados (Campbell y col., 1993, 1994) y son como se describen en la siguiente sección pertinente, como alternativa el núcleo puede introducirse por inyección manual de la célula donante en el ovocito enucleado (Ritchie y Campbell, J. Reproduction and Fertility Abstract Series N° 15, p60) o usando un aparato de piezo inyección disponible en el mercado como se ha demostrado en ratones (Wakayama y col., 1998). La coordinación de estos acontecimientos depende de la especie. Estos protocolos definen el uso de ovocitos ovinos, bovinos y porcinos madurados *in vivo* e *in vitro* acoplado con el uso de cigotos producidos *in vitro* o *in vivo*. El procedimiento no se limita a estos protocolos definidos.

## II) Cigotos

Para actuar como receptores para la segunda transferencia nuclear, se requieren cigotos u ovocitos fertilizados (antes de, de forma concomitante con o después de la activación). Actualmente se prefiere cigotos fertilizados, aunque no es esencial. Los ovocitos madurados pueden obtenerse por cualquier de los procedimientos mostrados anteriormente. El material genético puede eliminarse del ovocito como se ha descrito previamente. Los ovocitos pueden activarse tratando los ovocitos madurados con cualquier estímulo físico o químico o combinación de los mismos, que causa la activación y estimula el desarrollo. La coordinación de la aplicación del estímulo de activación variará en algún grado según tanto la especie como el procedimiento de maduración. Los cigotos fertilizados pueden obtenerse por fertilización *in vitro* de ovocitos madurados obtenidos de cualquiera de las fuentes anteriores o, como alternativa, pueden recuperarse *ex vivo* después de la copulación o IA usando animales donantes estimulados o no estimulados.

### 30 Primera fase de reconstrucción de embriones por transferencia nuclear

Pueden usarse células donantes en diferentes fases del ciclo celular para la reconstrucción de embriones. El receptor de citoplasto usado y cualquier tratamiento adicional requerido variarán en algún grado, dependiendo de la fase del ciclo celular de las células donante y receptora. La Tabla A da una serie de posibles combinaciones.

De hecho, puede usarse cualquier procedimiento que provoque la producción de una o más estructuras tipo pronúcleo, preferiblemente de diploidía normal o tetraploidía.

### 40 Segunda fase de transferencia nuclear de

En la segunda fase, una estructura tipo pronúcleo (preferiblemente identificada como una forma hinchaza del núcleo) del embrión reconstruido por la primera transferencia nuclear se transfiere a un MII enucleado (antes de, de forma concomitante con o después de la activación) o a un partenote activado o cigoto fertilizado que se ha enucleado por eliminación de los pronúcleos. Aunque cada uno de estos receptores de citoplasto es adecuado para la segunda transferencia nuclear, en la práctica un cigoto fertilizado enucleado es la elección preferida. El cigoto para actuar como receptor de citoplasto para la segunda transferencia nuclear puede producirse *in vivo* o *in vitro*, aunque en la práctica el uso de cigotos producidos *in vivo* es el procedimiento de elección actualmente. Como alternativa, puede usarse cualquier célula resultante del desarrollo del embrión de la primera transferencia nuclear o población celular cultivada derivada de este embrión como donante de material genético para la producción del embrión de la segunda transferencia nuclear.

### 55 Fuente de ovocito activado o cigoto

Pueden usarse ovocitos obtenidos de cualquier fuente *in vitro* o *in vivo* y posteriormente madurados *in vitro*, u ovocitos madurados *in vivo* como receptores para la segunda transferencia nuclear después de la enucleación y posterior activación o la activación y posterior enucleación. En la práctica, se prefiere que el citoplasto receptor para la segunda transferencia nuclear se prepare a partir de un cigoto fertilizado. El cigoto necesario para la producción de un receptor de citoplasto para la segunda transferencia nuclear puede obtenerse de cualquier fuente adecuada que puede incluir, aunque sin limitación, cigotos fertilizados producidos *in vivo* que se recuperan de un animal donante adecuado. Los cigotos pueden producirse por copulación natural, por copulación natural después de superovulación o por IA usando semen reciente o congelado. Como alternativa, los cigotos fertilizados pueden producirse *in vitro*. La fertilización *in vitro* puede realizarse sobre ovocitos madurados *in vivo* de donantes adecuados con o sin superovulación o usando ovocitos madurados *in vitro* después de la recuperación del material del matadero o de la aspiración de los folículos *in vivo*. En la práctica, se prefiere que el cigoto para la segunda transferencia nuclear se obtenga después de maduración y fertilización *in vivo*.

*Enucleación de cigotos*

Después de la fertilización satisfactoria, la cromatina masculina y femenina en el cigoto recién formado se descon-  
densa y forma dos pronúcleos. El material genético puede eliminarse en cualquier punto después de la fertilización.  
5 Sin embargo, en la práctica, el presente procedimiento de elección es retirar el material genético después de la forma-  
ción de los pronúcleos. Debido a la naturaleza del citoplasma, a menudo es difícil visualizar y eliminar los pronúcleos  
de un cigoto fertilizado. Puede ayudarse a la visualización de los pronúcleos por centrifugación de los cigotos antes  
de su manipulación, aunque esto no es esencial.

*Preparación de un donante de carioplasto del embrión de la primera transferencia nuclear*

El(los) pronúcleo(s) formado(s) en los embriones reconstruidos por la primera transferencia nuclear debe(n) eli-  
minarse y transferirse al segundo receptor de citoplasto. Para visualizar el(los) pronúcleo(s), los embriones preferi-  
blemente se centrifugan. Después se realiza la aspiración de un pronúcleo rodeado por citoplasma y envuelto en una  
15 membrana celular, preferiblemente por microcirugía. Para facilitar este proceso, aunque sin necesidad, el embrión  
puede hacerse más plegable por tratamiento con uno o más compuestos químicos, que alteran el citoesqueleto, por  
ejemplo, citocalasina B, o nocodazol. El embrión centrifugado es preincuba en el(los) agente(s) de elección y después  
se transfiere a una cámara de manipulación. Usando una pipeta de vidrio fino, se aspira un carioplasto que contiene un  
20 pronúcleo.

*Reconstrucción del embrión de la segunda transferencia nuclear*

El carioplasto formado a partir del embrión de la primera transferencia nuclear se usa para transferir el material  
genético ahora contenido dentro de la estructura tipo pronúcleo al segundo citoplasto receptor enucleado. Puede usarse  
cualquier medio de transferencia incluyendo la fusión del carioplasto al citoplasto por medios virales, químicos o  
eléctricos o como alternativa el pronúcleo puede inyectarse en la célula receptora. Debido al tamaño del pronúcleo, se  
prefiere, aunque no es esencial, que el material genético se transfiera por el proceso de fusión celular. Para la fusión  
30 celular, el carioplasto se transfiere por debajo de la zona pelúcida del segundo receptor de citoplasto y se pone en  
contacto con el cigoto enucleado. Después puede aplicarse cualquier medio físico, químico o viral para inducir la  
fusión celular. Sin embargo, actualmente es preferible, aunque no esencial, usar fusión eléctrica. Para fusión eléctrica,  
el pareado se coloca en un medio adecuado en una cámara de fusión adecuada. Después se pasa un pulso eléctrico de  
CC a través del pareado a ángulos rectos al plano de contacto entre el citoplasto y el carioplasto. Primero puede usarse  
35 un pulso eléctrico de CA para alinear y/o aumentar el contacto entre el citoplasto y el carioplasto. La duración, fuerza y  
ritmo del(de los) pulsos(s) eléctrico(s) afecta todo a la frecuencia de fusión y puede optimizarse por experimentación.

*Cultivo de embriones de la segunda transferencia nuclear*

Después de la reconstrucción del embrión de la transferencia nuclear, puede realizarse desarrollo adicional culti-  
vándolo en medio adecuado *in vitro* hasta alcanzar una fase del desarrollo adecuada para la transferencia a un receptor  
sustituto final. Como alternativa, los embriones reconstruidos pueden cultivarse en el oviducto ligado de un receptor  
intermedio, sincronizado y adecuado durante el tiempo suficiente para alcanzar una fase del desarrollo adecuada para  
45 la transferencia a un receptor sustituto final. O como es el procedimiento de elección actualmente en especies porcinas,  
el embrión reconstruido por la segunda transferencia nuclear puede transferirse directamente al receptor sustituto final  
y mantenerse las preñez por tratamiento hormonal (véase a continuación).

*Transferencia al receptor sustituto final*

Los embriones reconstruidos pueden cultivarse por cualquier medio *in vitro* o *in vivo* hasta cualquier fase adecuada  
para su transferencia a un receptor final sincronizado para su desarrollo a término. Como alternativa, los embriones  
reconstruidos pueden transferirse lo más pronto posible a un receptor sincronizado para su desarrollo a término. El  
55 último procedimiento es actualmente el procedimiento de elección en especies porcinas. En esta situación, la inducción  
y mantenimiento de la preñez en el receptor final puede conseguirse por cualquiera de los siguientes procedimientos.  
En el momento de la transferencia, los embriones producidos *in vivo* en la misma fase del desarrollo que los embriones  
reconstruidos por transferencia nuclear pueden transferirse con la transferencia nuclear. Como alternativa, el receptor  
puede tratarse con una combinación de hormonas para mantener la preñez (Christenson y *col.*, J. Animal Science 1971;  
60 32: 282-286).

Los procedimientos de transferencia nuclear abarcan modificación genética como se conoce en la técnica para  
proporcionar animales transgénicos en todas las fases. El término "transgénico" se refiere ampliamente a cualquier fase  
animal cuya línea germinal se haya sometido a intervención técnica por tecnología de ADN recombinante. Esto incluye  
65 la introducción de material genético de otras especies así como un animal en cuya línea germinal se ha delecionado,  
duplicado, activado o modificado un gen endógeno.

El material genético (núcleo donante) puede modificarse en cualquier fase en la metodología de transferencia nuclear doble. Más preferiblemente, la intervención recombinante se realiza antes de la primera etapa de transferencia nuclear. La intervención recombinante puede realizarse entre la primera y la segunda etapas de transferencia nuclear.

Para la intervención recombinante antes de la primera etapa de transferencia nuclear, el material genético, preferiblemente, se modifica como parte de una modificación de la línea celular o se toma de un animal previamente modificado. Puede introducirse un nivel de selección para identificar los núcleos donantes para la etapa de transferencia nuclear. Como alternativa, o adicionalmente, la intervención recombinante puede realizarse después de la primera etapa de transferencia nuclear y antes de la segunda. En este escenario, la célula obtenida puede modificarse genéticamente por el mismo procedimiento o uno diferente.

La presente invención incluye el uso de ovocitos no enucleados como receptores de citoplasma para la reconstrucción de embriones por transferencia nuclear.

El desarrollo de los embriones reconstruidos por transferencia nuclear depende de muchos factores que incluyen la fase del ciclo celular, tanto del citoplasma receptor como del núcleo donante. La capacidad para sincronizar los blastómeros de embriones murinos tempranos ha permitido estudios detallados de combinaciones del ciclo celular de citoplasma/carioplasma. Informes sobre ratones han demostrado el uso de células mitóticamente detenidas como donantes de material genético (Kwon y Kono, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 13010-13013).

Cuando se usan células somáticas como donantes nucleares, se ha demostrado que las células detenidas en la fase G0 (quiescentes) del ciclo celular son capaces de dirigir el desarrollo a término de los embriones reconstruidos por transferencia nuclear. Se ha informado de que la cromatina de células quiescentes experimenta condensación, estas células también muestran una reducción en la transcripción y la traducción, el ARNm se degrada activamente y se producen cambios en los polirribosomas (Whitfield, J. F., y col. (1985) En Control of Animal cell proliferation, Eds Boynton A. L. y Leffert, H. L., p331-365, Academic Press Inc: Londres). Las células quiescentes reducen su metabolismo hasta el necesario para mantener la viabilidad.

Más recientemente, otros investigadores han demostrado que genes transcripcionalmente inactivos se localizan en la heterocromatina centromérica en los núcleos de linfocitos B primarios en proliferación pero no en los quiescentes. La estimulación de células quiescentes para que vuelvan a entrar en el ciclo de crecimiento causa la recolocación de loci inactivos en las regiones centroméricas (Brown y col., *Mol Cell Biol.* 3, 207-217). Por tanto, la cromatina de las células quiescentes puede ser más susceptible a sufrir cambios estructurales después de la transferencia nuclear que están asociados con la "reprogramación" de la expresión génica.

La capacidad para utilizar diferentes combinaciones de ciclo celular de las células donantes y receptoras depende de la especie. En ratones, se obtiene un huso organizado intacto cuando los núcleos en fase G2 o M se transfieren a ovocitos MII enucleados. En la activación se produce un acontecimiento "seudo-mitótico/meiótico"; se expulsa un cuerpo polar y se forma un núcleo diploide. Como alternativa, la supresión de la expulsión del cuerpo polar por tratamiento con citocalasina B produce un embrión tetraploide con 2 pronúcleos diploides. Cada uno de estos pronúcleos puede usarse (satisfactoriamente) como donante nuclear para un cigoto enucleado. En ganado vacuno, ovejas y cerdos, después de la transferencia de un núcleo de un blastómero diploide (G1) o una célula somática en un ovocito MII enucleado, no se observa un huso organizado y no hay informes de expulsión del cuerpo polar que sugiera que, de hecho, no se forma un huso organizado. Asimismo, en ganado vacuno, cuando un núcleo G2 se transfiere a un ovocito MII enucleado no se observa un huso organizado, sin embargo, si el ovocito no está enucleado, se observan 2 husos organizados, uno del ovocito MII original y el segundo organizando los cromosomas derivados del núcleo donante.

Estas diferencias en la organización del huso pueden usarse para sacar provecho. Pueden transferirse núcleos en las fases G2 o M del ciclo celular a un ovocito en maduración bien I) en un punto después de la metafase de la primera división meiótica, es decir, entre MI y MII, o ii) en MII. En MII habría 2 husos presentes, uno del ADN materno y el otro del ADN transferido. La activación del ovocito receptor puede evitarse por procedimientos conocidos en la técnica, es decir, eliminación de calcio del medio de cultivo, manipulación o de fusión. La cromatina transferida que se condensa en cromosomas después puede dejarse "acondicionar" en el citoplasma receptor durante un periodo que depende de la especie y de la edad del ovocito receptor. La cromatina materna puede eliminarse después de la formación de un huso intacto que contiene la cromatina donante, o, como alternativa, después de la activación del ovocito reconstruido. La activación puede conseguirse por procedimientos habituales en la técnica, con la excepción de que debe mantenerse la integridad del huso. En la activación, el ADN transferido experimenta una división pseudo-mitótica/meiótica y expulsa un cuerpo polar, lo que proporciona un embrión diploide. Como alternativa, la expulsión del cuerpo polar podría evitarse con compuestos habituales en la técnica, por ejemplo, citocalasina B, y el cigoto resultante tendría 2 pronúcleos diploides, cada uno de los cuales podría usarse para su transferencia a un cigoto enucleado o un ovocito enucleado activado.

El ADN del ovocito original o materno podría eliminarse selectivamente después de su identificación por varios medios:

1. Por observación del 1<sup>er</sup> cuerpo polar y aspiración del citoplasma y el huso meiótico directamente desde debajo del cuerpo polar antes de la activación - esto depende de la edad del ovocito receptor ya que el cuerpo polar se descompone a medida que aumenta la edad.

2. O la cromatina materna o la donante puede teñirse selectivamente antes de la reconstrucción con un colorante específico de ADN que, después, permitirá la eliminación selectiva de los cromosomas teñidos o no teñidos antes de la activación.

3. Como en 3, con la posterior eliminación de los cromosomas o el posterior pronúcleo después de la activación.

4. Por el uso de células donantes transgénicas que contienen un gen marcador específico dirigido por una secuencia promotora específica de G0.

#### 10 *Ejemplos del uso de ovocitos no enucleados*

Los protocolos descritos para la producción de ovocitos como receptores para los procedimientos de la 1ª transferencia nuclear como se ha descrito en lo que antecede son todos adecuados para el uso de ovocitos no enucleados. La transferencia del núcleo donante puede conseguirse como se ha descrito previamente usando fusión inducida de forma eléctrica, química o viral, o inyección por cualquier medio, incluido el uso de un dispositivo piezo. La enucleación después de la transferencia del núcleo donante puede conseguirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. La coordinación de los diversos procedimientos variará entre especies y dependerá de la fuente de ovocitos y se determinará experimentalmente.

Las células donantes deben ponerse en un fluorocromo específico de ADN adecuado para teñir el ADN - es decir, 1 microgramo de Hoescht 3332 durante 10 minutos en medio de cultivo seguido de incubación en medio que carece del tinte. La transferencia del núcleo puede realizarse en cualquier momento después de la aparición de la telofase de la 1ª división meiótica que puede observarse de forma microscópica por la aparición de una pequeña protuberancia en la pared celular del ovocito, lo que es bien conocido por los expertos en la técnica. La manipulación y la reconstrucción de los ovocitos receptores se prefiere realizar en un medio que carezca de calcio para evitar la activación. Después, los ovocitos reconstruidos pueden cultivarse hasta que se elimine el ADN materno. Se deja suficiente tiempo para la formación del huso mitótico (esto variará entre especies y con las condiciones de cultivo, y también según el ritmo de reconstrucción). En el caso de receptores en telofase 1, se deja suficiente tiempo para que la cromatina materna del ovocito maternal alcance MII. La enucleación de la cromatina materna puede conseguirse en MII mediante breve exposición a luz UV para su visualización e identificación de la cromatina teñida. Como alternativa, los ovocitos pueden activarse y después exponerse a UV para la identificación de la cromatina donante en cualquier momento antes y después de la formación pronuclear. Después de la eliminación de la cromatina materna y la activación, se cultivan los supuestos cigotos por cualquier medio conocido en la técnica hasta una fase adecuada para la transferencia a un receptor final sincronizado para el desarrollo a término. El ovocito no enucleado se usa, preferiblemente, en la primera etapa de transferencia nuclear. Puede usarse en la segunda.

Un quinto aspecto de la invención proporciona un procedimiento para obtener células clonales pluripotentes o totipotentes (incluyendo una población celular clonal pluripotente o totipotente), comprendiendo el procedimiento cultivar una célula de un embrión transgénico no humano o feto transgénico no humano, de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, o de un adulto desarrollado a partir de dicho embrión o feto. Las características preferidas de los aspectos uno a cuatro también se aplican al quinto aspecto.

En este aspecto de la invención "pluripotente" y "totipotente" se refieren a La capacidad para las células, bajo los estímulos apropiados, de diferenciarse en algunos (pluripotente) o todos (totipotente) los tipos tisulares presentados en un animal adulto.

Un sexto aspecto de la invención proporciona una célula o población celular clonal pluripotente o totipotente que se puede obtener por el procedimiento de acuerdo con el quinto aspecto de la invención. Las características preferidas de los aspectos uno a cinco también se aplican a sexto aspecto.

Para todos los aspectos de la invención, está claro que puede tener lugar más de un acontecimiento de modificación génica dirigida. Por ejemplo, en una única célula primaria puede haber un acontecimiento de modificación génica dirigida para eliminar o inactivar el material genético y un acontecimiento de modificación génica dirigida para introducir un transgén. También se prevén más de dos acontecimientos de modificación génica dirigida. Los más de un acontecimiento de modificación génica dirigida pueden tener lugar simultáneamente, posteriormente o secuencialmente en el mismo pase o en un pase diferente. Como alternativa, puede tener lugar un segundo acontecimiento de modificación génica dirigida o adicional en una célula obtenida de un embrión, feto o adulto que se desarrolló a partir de una célula somática original de acuerdo con la presente invención.

El proceso de reconstrucción de embriones y producción de descendencia viable por transferencia nuclear es un procedimiento de múltiples etapas, cada una de las cuales se describirá ahora con detalle. También se describen más detalles con respecto a la modificación génica dirigida de acuerdo con la presente invención. Todos los siguientes detalles se aplican a la invención descrita en este documento. Además, los siguientes términos se mencionan en este texto y aquí se exponen sus expresiones completas:

Célula ES - célula madre embrionaria;

Célula EG - célula germinal embrionaria;

## ES 2 338 631 T3

MII - metafase II;

PCR - reacción en cadena de la polimerasa;

5 RH - recombinación homóloga;

AAV - virus adeno-asociado;

DAF - factor acelerador de la descomposición;

10

MCP - proteína cofactora de membrana;

CD59 - inhibidor de membrana de la lisis reactiva;

15

HPRT - hipoxantina fosforribosiltransferasa;

gpt - xantina guanina fosforribosultransferasa;

LIF - factor inhibidor de leucemia;

20

GFP - proteína verde fluorescente;

IRES - sitio de entrada interno de ribosomas

25

AAT - antitripsina alfa 1

BLG - lactoglobulina beta

a1,3 GT -  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa

30

### *La Célula o Citoplasto Receptor*

35 Los ovocitos, cigotos fertilizados y embriones de dos células se han usado como receptores de citoplasto para la transferencia nuclear. En general, los ovocitos detenidos en metafase de la segunda división meiótica (también llamados óvulos no fertilizados, u ovocitos MII) se han convertido en el citoplasto de elección. En este punto en el desarrollo del ovocito, el material genético se organiza sobre el huso meiótico y se elimina fácilmente usando medios mecánicos. Varios informes han demostrado que durante la maduración, es decir, entre la fase de vesícula germinal (profase de la primera división) y la detención en metafase de la segunda división meiótica, el ADN genómico puede eliminarse y usarse el citoplasto resultante para transferencia nuclear (Kato y *col.*, Mol Reprod Dev 36, 276-8, 1993). Se ha informado del uso de cigotos fertilizados como receptores de citoplasto en ratones (Kwon y *col.*, Proc Natl Acad Sci USA, 93, 13010-3, 1996), ganado vacuno (Prather y *col.*, J. Reprod Fertil Suppl 41, 1990), y cerdos (Prather y *col.*, Biol. Reprod. 41, 414-8, 1989). En ganado vacuno y cerdos, el desarrollo de embriones reconstruidos usando cigotos como receptores de citoplasto es bajo y globalmente está restringido al intercambio de pronúcleos, lo que sugiere que se eliminan factores esenciales para el desarrollo satisfactorio con los pronúcleos.

45

### *Preparación de Receptor de Citoplasto por Eliminación del Material Genético Genómico*

50 Este proceso se ha llamado en general enucleación. En la mayoría de los receptores utilizados, el ADN genómico no está encerrado dentro de una membrana nuclear en el momento de la eliminación. La eliminación del material genético de acuerdo con la presente invención y descrita por el término "enucleación" no requiere que el material genético esté presente en una membrana nuclear (puede estar o puede no estar, o puede estar parcialmente). La enucleación puede conseguirse físicamente por eliminación real del núcleo, los pronúcleos o la placa metafásica (dependiendo de la célula receptora), o funcionalmente, tal como por la aplicación de radiación ultra-violeta u otra influencia de enucleación. La eliminación del material genético es posible por medios físicos y/o químicos. En los primeros informes de transferencia nuclear, los ovocitos MII simplemente se cortaban por la mitad en base a que una mitad contendría el material genético y la otra no. Se han hecho modificaciones a este enfoque para reducir el volumen de citoplasma, que se eliminó. Esto puede conseguirse por aspiración de una pequeña cantidad de citoplasma desde directamente por debajo del 1<sup>er</sup> cuerpo polar usando micropipetas de vidrio o usando una cuchilla para cortar la parte del ovocito por debajo del cuerpo polar. Para facilitar la plasticidad del ovocito puede pre-tratarse con citocalasina B u otro de dichos agentes que altere el citoesqueleto. En contraste con la enucleación física, se ha demostrado que el tratamiento químico causa una eliminación completa del material genético en ratones. El tratamiento de ovocitos en maduración con el inhibidor de topoisomerasa etopósido provoca la expulsión de todos el material genómico con el 1<sup>er</sup> cuerpo polar (Elsheikh y *col.*, Jpn J Vet Res 45, 217-20, 1998), sin embargo, no se ha descrito desarrollo a término usando receptores de citoplasto producidos por este procedimiento y no hay informes de este procedimiento en otras especies. Se ha informado de que la centrifugación de ovocitos MII combinada con tratamiento con citocalasina B causa la enucleación en ovocitos de hámster y ganado vacuno (Tatham y *col.*, Hum Reprod 11, 1499-503, 1996). Se ha informado del desarrollo de

65



## ES 2 338 631 T3

embriones reconstruidos a partir de dichos citoplastos en ganado vacuno, sin embargo, la frecuencia de desarrollo es baja.

- 5 Cuando se usan cigotos, el material genético puede eliminarse por aspiración mecánica de ambos. Dependiendo de la especie, para facilitar la visualización de los pronúcleos, los cigotos pueden centrifugarse antes de la enucleación.

### *Introducción de material genético (reconstrucción de embriones)*

- 10 Habiendo preparado una célula o citoplasto receptor adecuado, debe introducirse el material genético donante. Se ha informado de diversas técnicas, incluyendo;

1. Fusión celular inducida por medios químicos, virales o eléctricos.
- 15 2. Inyección de una célula intacta por cualquier procedimiento
3. Inyección de una célula lisada o dañada.
4. Inyección de un núcleo.

- 20 Cualquiera de estos procedimientos puede usarse en cualquier especie o en una combinación de especies con algunas modificaciones de protocolos individuales.

### *Activación del embrión reconstruido*

- Además de la transferencia de material genético donante desde el carioplasto al citoplasto, el citoplasto debe estimularse para iniciar el desarrollo. Cuando se usa un cigoto fertilizado como receptor de citoplasto, el desarrollo ya se ha iniciado por la entrada de esperma en la fertilización. Cuando se usan ovocitos MII como receptores de citoplasto, el ovocito debe activarse por otros estímulos. Se ha informado de diversos tratamientos para inducir la activación del ovocito y promover el desarrollo embrionario temprano incluyendo, aunque sin limitación; la aplicación de un estímulo eléctrico de CC, el tratamiento con etanol, ionomicina, inositol tri-fosfato (IP<sub>3</sub>), ionóforo de calcio A23187, el tratamiento con extractos de esperma o cualquier otro tratamiento que induzca la entrada de calcio en el ovocito o libere los almacenes internos de calcio y provoque el inicio del desarrollo. Además puede aplicarse cualquiera de estos tratamientos en combinación, su aplicación al mismo tiempo o en momentos diferentes o en combinación con inhibidores de la síntesis de proteínas (es decir, cicloheximida o puromicina) o inhibidores de proteína cinasas de serina y treonina (es decir, 6-DMAP).

### *Cultivo de embriones reconstruidos*

- Los embriones reconstruidos por transferencia nuclear pueden cultivarse *in vitro* hasta una fase adecuada para la transferencia a un receptor final usando cualquier medio de cultivo o proceso de cultivo adecuado. Los embriones reconstituidos pueden cultivarse de otro modo *in vitro* hasta que se usen en la producción de células totipotentes o pluripotentes clonadas, de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. Como alternativa, los embriones pueden cultivarse *in vivo* en el oviducto ligado de un animal hospedador adecuado (en general, ovejas) hasta que se alcance una fase adecuada para la transferencia a un receptor sustituto final para que el animal crezca a término. Los embriones de ganado vacuno, ovejas y otras especies pueden cultivarse en un receptor transespecie; por simplicidad una oveja proporciona un receptor adecuado para especies bovinas, ovinas y porcinas. Es habitual incluir los embriones en una capa protectora de agar o material similar para evitar el daño mecánico a los embriones reconstruidos o el ataque por macrófagos mientras están en el oviducto del receptor temporal.

### *Modificación génica dirigida y células madre embrionarias*

- 55 La modificación génica dirigida por recombinación homóloga entre una construcción de ADN exógena y secuencias cromosómicas afines permite que se hagan modificaciones precisas en sitios predeterminados en el genoma. La modificación génica dirigida está bien establecida en células madre embrionarias (ES) de ratón, y se ha usado para realizar modificaciones en una gran cantidad de genes murinos (resumido por Brandon y col., Curr. Biol. 5, 625-634, 758-765, 873-881, 1995). Esto se ha visto facilitado por la facilidad con que las modificaciones genéticas diseñadas en células ES *in vitro* pueden transferirse a ratones completos y las consecuencias de la modificación génica dirigida estudiada (revisado por Papaioannou y Johnson, En: Gene targeting: a practical approach. Ed Joyner, A.L. Oxford University Press, 1992; y por Ramirez-Solis y Bradley Curr Opin. Biotech. 5, 528-533, 1994). Las células ES de ratón son células pluripotentes obtenidas de embriones tempranos (Evans y col., Nature 292, 154-156, 1981) que pueden cultivarse y manipularse *in vitro*, después reintroducirse en el embrión previo a la implantación donde pueden contribuir a todos los tipos celulares de un animal quimérico, incluyendo células germinales (Robertson, E. J., (Ed.) 1987, Teratocarcinomas and embryonic stem cells. A practical approach. IRL Press, Oxford.). Los beneficios potenciales de diseñar modificaciones genéticas precisas por modificación génica dirigida en especies diferentes de los ratones, por

ejemplo, ganado, se han descrito muchas veces (por ejemplo, Colman y Garner, *Pharmaceutical Forum* 5, 4-7, 1996). Estos incluyen, aunque sin limitación, la producción de proteínas terapéuticas humanas en los fluidos corporales, prevención de enfermedades, el aumento de rasgos de producción requeridos, terapias basadas en células, sistemas de suministro basados en células para terapia génica, transplante de tejidos y órganos.

Por lo tanto se han hecho grandes esfuerzos para obtener líneas ES de una amplia diversidad de especies. Sin embargo, no se han demostrado líneas celulares ES definitivas, es decir, capaces de contribuir a la línea germinal de un animal quimérico, a partir de ninguna especie de mamífero diferente del ratón. El estado de las células ES humanas (Thomson y *col.*, *Science* 282, 1145-7, 1998), sigue siendo desconocido a este respecto a causa de restricciones éticas. Hay informes de líneas celulares ES o en su lugar tipo ES obtenidas de hámster, visón, oveja (Piedrahita y *col.*, *Theriogenology* 34, 879-901, 1990), ganado vacuno (Stice y *col.*, *Biol. Reprod.* 54, 100-110, 1996), cerdo (Gerfen y *col.*, *Anim. Biotechnol.* 6, 1-14, 1995) y mono rhesus (Thomson y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7844-7848, 1995). En todos estos casos, se ha usado la definición más limitada de "células que en las condiciones *in vitro* apropiadas, pueden diferenciarse a lo largo de al menos tres linajes diferentes" para sostener las afirmaciones de que las células obtenidas representan células ES. También se ha informado de la producción de quimeras de cerdo (Wheeler, *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 1-6, 1994) y rata, aunque en ningún caso se ha demostrado contribución ES a la línea germinal.

Las células germinales embrionarias (EG) son células no diferenciadas funcionalmente equivalentes a células ES, es decir, pueden cultivarse y transfectarse *in vitro*, entonces contribuyen a los linajes celulares somático y germinal de una quimera (Stewart, *Dev. Biol.* 161, 626-628, 1994). Las células EG se obtienen por cultivo de células germinales primordiales, las progenitoras de los gametos, con una combinación de factores de crecimiento: factor inhibidor de leucemia, factor steel y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (Matsui y *col.*, *Cell* 70, 841-847, 1992; Resnick y *col.*, *Nature* 359, 550-551, 1992).

Se han hecho varios intentos por aislar líneas EG de células germinales primordiales en ganado vacuno (Cherny, y *col.*, *Theriogenology* 41, 175, 1994; Stokes, y *col.*, *Theriogenology* 41, 303, 1994), cerdos (Shim, y *col.*, *Biol. Reprod.* 57, 1089-1095, 1997; Piedrahita y *col.*, *Biol. Reprod.* 58, 1321-1329, 1998) y ratas (Mitani, y *col.*, *Theriogenology* 41, 258, 1994). La inyección de blastocistos de células EG cultivadas condujo a la producción de embriones bovinos quiméricos de media gestación (Stokes, *Theriogenology* 41, 303, 1994). Más recientemente se han producido lechones macho quiméricos a partir de células EG tanto manipuladas genéticamente (Piedrahita, y *col.*, *Biol. Reprod.* 58, 1321-1329, 1998) como normales (Shim, y *col.*, *Biol. Reprod.* 57, 1089-1095, 1997). En ambos casos, se detectó contribución de las células EG a los testículos. Desafortunadamente no pudo establecerse la capacidad para este enfoque de conseguir la transmisión de la línea germinal, ya que uno de los animales nació muerto y el otro no consiguió prosperar y se sacrificó.

La ausencia de células ES o EG animales grandes completamente funcionales, sin embargo, se ha obviado por desarrollos en transferencia nuclear que permiten hacer modificaciones genéticas a células somáticas en cultivo y después usar esas células como donantes nucleares para producir un animal completo, como se demuestra por Schnieke y *col.* (*Supra*).

#### *Modificación génica dirigida en células somáticas*

Ha habido considerablemente menos trabajo sobre modificación génica dirigida en células somáticas. La eficacia con que pueden obtenerse clones con modificación génica dirigida es una función de la frecuencia de los acontecimientos de recombinación homóloga (RH) y la frecuencia de los acontecimientos de integración aleatoria. En todos los tipos celulares de mamífero, los acontecimientos de RH son significativamente menos frecuentes que los acontecimientos aleatorios. Distinguir los acontecimientos de RH frente a un fondo de integrantes aleatorios representa un obstáculo principal para el aislamiento de clones con modificación génica dirigida. Los resultados de experimentos publicados indican que la modificación génica dirigida en células somáticas es poco frecuente, estimaciones de la proporción de acontecimientos de RH a aleatorios varían de 1:50 ó 1:230 en fibrosarcoma (Itzhaki y *col.*, *Nat. Genet.* 15, 258-265, 1997), 1:241 en células de leucemia mieloide (Zhen y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9832-9836, 1993), 1:1000 en carcinoma de vejiga (Smithies y *col.*, *Nature* 317, 230-234, 1985), a 1:9700 en células de fusión de eritroleucemia/linfoblasto (Shesely y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4294-4298, 1991). Sin embargo, estos datos se obtuvieron de una gama de líneas celulares inmortalizadas y describen la modificación dirigida de diferentes loci génicos con diferentes construcciones de modificación génica dirigida.

En aquellos pocos casos en los que se ha usado la misma construcción para abordar el mismo locus tanto en células ES como en células somáticas, los datos comparativos indican que la proporción de acontecimientos de integración por RH a aleatorios puede ser significativamente inferior en células somáticas (Arbones y *col.*, *Nat. Genet.* 6, 90-97, 1994). Las células recombinogénicas del sistema inmune, tales como las células B, representan una excepción especial (Buerstedde y *col.*, *Cell* 67, 179-188, 1991; Takata, M. y *col.*, *EMBO J.* 13, 1341-1349, 1994).

La comparación de la frecuencia de recombinación homóloga entre célula somática inmortalizadas y primarias indica que la recombinación homóloga es menos frecuente en células primarias que en líneas celulares inmortalizadas (Finn y *col.*, *Mol. Cell. Biol.* 9, 4009-4017, 1989; Thyagarajan y *col.*, *Nuc. Acids Res.* 24, 4084-4091, 1996). Esto es importante para la producción de animales por transferencia nuclear porque se prefieren células normales, euploides,

no immortalizadas como donantes nucleares a causa del riesgo de que las células immortalizadas no puedan soportar el desarrollo o puedan conducir a tumores en el animal resultante.

Una consecuencia indeseable de una baja frecuencia de recombinación homóloga es que es necesario transfectar y explorar grandes poblaciones del tipo celular elegido para asegurar la obtención de clones celulares con modificación génica dirigida. Aunque las células ES y EG pueden experimentar periodos extensivos en cultivo y aún usarse para obtener animales completos, las células primarias tienen una vida limitada en cultivo y su competencia como donantes nucleares puede reducirse por alteraciones genéticas que suceden *in vitro*. Esto imposibilita proporcionar grandes poblaciones de células primarias por expansión en cultivo y periodos extensivos de cultivo para permitir la identificación de clones celulares con modificación génica dirigida entre un elevado fondo de transfectantes aleatorios. Por lo tanto, existe la expectativa de que si ocurrieran acontecimientos de modificación génica dirigida en células primarias, la frecuencia de dichos acontecimientos sería demasiado inusual para permitir el uso práctico de clones celulares con modificación génica dirigida para obtener animales completos por transferencia nuclear.

#### Factores que afectan a la frecuencia de modificación génica dirigida

Se han identificado numerosos factores que afectan a la frecuencia de modificación génica dirigida. Como se ha indicado anteriormente, hay menos datos disponibles respecto a los factores críticos para la modificación génica dirigida en células somáticas que en células ES.

Se ha demostrado que la frecuencia de modificación génica dirigida en células somáticas aumenta drásticamente con la longitud de la región de homología en el vector de modificación dirigida (Scheerer, y *col.*, Mol. Cell. Biol. 14, 6663-6673, 1994).

Se ha demostrado que el uso de ADN isogénico a la célula hospedadora mejora la frecuencia de modificación génica dirigida en células madre embrionarias (Deng y *col.*, Mol Cell Biol. 12,3365-3371, 1992; te Riele y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5128-5132, 1992). Sin embargo, esto no se ha investigado en células somáticas.

El efecto de la transcripción del gen diana sobre la frecuencia de recombinación homóloga es objeto de algunas disputas. Algunos de los informes más antiguos de modificación génica dirigida demostraron modificaciones por modificación dirigida realizadas a genes que son inactivos en el tipo celular usado (Smithies y *col.*, Nature, 317, 230-234, 1985; Johnson, y *col.*, Science 245, 1234-1236, 1989). Sin embargo, se ha propuesto que la recombinación homóloga en un locus génico es más frecuente cuando el gen se transcribe activamente que cuando está inactivo (Nickolof y *col.*, Mol. Cell. Biol. 10, 4837-4845, 1990; Thyagarajan y *col.*, Nucleic Acids Res. 23, 2784-2790, 1995). Esta propuesta se ha rebatido por Yanez y Porter, que informan de que no hay correlación entre la frecuencia de modificación génica dirigida y el estado transcripcional del gen 6-16 inducible por interferón en células HT1080 humanas (Gene Therapy, 5, 149-159, 1998).

La presencia de roturas en la doble hélice en el locus diana ha demostrado estimular la modificación génica dirigida en células CHO (Liang y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8929-8933, 1996) pero no en células Ltk<sup>-</sup> de ratón (Lukacsovich y *col.*, Nuc. Acids Res. 22, 5649-5657, 1994). Sin embargo, también se ha demostrado que roturas en la doble hélice estimulan el nivel de recombinación ilegítima en células CHO (Sargent y *col.*, Mol Cell Biol. 17, 267-277, 1997). El riesgo consecuente de introducir aberraciones genéticas reduce la utilización de este enfoque para células destinadas a la transferencia nuclear. Esto también se aplica a otros procedimientos para estimular la recombinación homóloga por la inducción de daños en el ADN, por ejemplo, carcinógenos químicos, radiación UV, radiación gamma y moléculas fotorreactivas (revisado por Yanez y Porter, Gene Therapy, 5, 149-159, 1998).

Los investigadores en el campo tienen la percepción generalizada de que para conseguir modificación génica dirigida, debe introducirse ADN vector en la célula hospedadora por electroporación, o más raramente por microinyección. Un estudio general de la bibliografía extensiva que describe la modificación génica dirigida (resumido por Brandon y *col.*, *supra*) indica que la electroporación es hasta ahora el procedimiento preferido en la técnica.

La técnica también muestra que linealizar el vector de modificación génica dirigida antes de introducirlo en la célula hospedadora aumenta drásticamente la frecuencia de modificación génica dirigida (revisado por Yanez y Porter, *supra*). De nuevo, un estudio general de la bibliografía que describe la modificación génica dirigida indica que los vectores de modificación génica dirigida se usan en forma lineal. Por lo tanto, la expectativa era que se requeriría el uso de ADN lineal para la modificación génica dirigida en células somáticas para todos los loci diana en células somáticas.

Yanez y Porter (*supra*) también revisan otros factores que afectan a la tasa de recombinación homóloga. Estos incluyen las condiciones de crecimiento del cultivo celular hospedador, la fase del ciclo celular de la célula hospedadora, la modificación de los extremos del ADN introducido por transfección linealizado, la inactivación del gen MSH2 y la inhibición de la actividad enzimática poli ADP ribosa polimerasa.

*Procedimientos para enriquecer o identificar acontecimientos de modificación génica dirigida*

Hay varios procedimientos por los cuales pueden enriquecerse o identificarse las células que posiblemente portan acontecimientos de modificación dirigida inusuales entre una población transfectada.

Los transfectantes pueden dividirse en combinaciones y explorarse la presencia de clones dirigidos en cada combinación, típicamente por la reacción en cadena de la polimerasa. Las combinaciones positivas después se subdividen progresivamente y se vuelven a explorar hasta haber aislado un único clon (Shesely, y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4294-4298, 1991). Sin embargo, como se ha mencionado previamente, dichos esquemas son inadecuados para células primarias destinadas para transferencia nuclear, porque rondas repetidas de purificación prolongan el tiempo en cultivo. Un cultivo prolongado es indeseable porque las células primarias pueden volverse senescentes o adquirir aberraciones genéticas.

El uso de vectores de modificación génica dirigida que maximicen la frecuencia de la diana y permitan la sección de los clones dirigidos sin aumentar el tiempo consumido en el cultivo es más apropiado para células destinadas para transferencia nuclear. Las estrategias de modificación génica dirigida tales como captura de potenciador, captura de promotor y captura de poliadenilación se describen con detalle por Hasty y Bradley (En: Gene targeting: a practical approach. Ed Joyner, A.L. Oxford University Press, 1992) y se analizan posteriormente en este texto.

*Otros procedimientos de modificación génica dirigida*

Se ha informado de tasas de recombinación homóloga muy elevadas usando oligonucleótidos de ARN/ADN químicos para modificar de forma dirigida el gen de la  $\beta$ -globina en células linfoblastoides (Cole-Strauss, Science 273, 1386-1389, 1996) y el gen del Factor IX tanto *in vitro* como *in vivo* (Kren, y *col.*, Nature Med. 4, 285-290, 1998). Desafortunadamente la tecnología no parece transferirse fácilmente y otros investigadores no han logrado aplicarla a su gen de elección (Strauss, Nature Medicine 4, 274-275, 1998).

Se han observado frecuencias de modificación dirigida elevadas con vectores de modificación génica dirigida basados en el virus adeno-asociado (AAV). Russell y *col.* (Nature Genetics 18, 325-330, 1998) informan de que 11 de 13 fibroblastos humanos primarios transfectados tenían un gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa correctamente dirigido.

Estos dos procedimientos están limitados en el tipo de modificación que puede diseñarse, porque se pueden realizar solamente unos pocos cambios de nucleótidos en el locus diana. Aunque esto permite la inactivación génica, por ejemplo, por la inserción de codones de parada, o una modificación sutil por la sustitución de aminoácidos individuales, estos procedimientos no permiten la inserción o reemplazo de regiones más grandes que son necesarias para el reemplazo de genes o colocación de transgenes.

En este texto, se describe la generación, identificación y aislamiento de células somáticas que portan modificaciones genéticas predeterminadas en un locus definido, la “modificación génica dirigida”, manteniendo al mismo tiempo la capacidad para esas células de soportar la producción, después de la transferencia nuclear, de i) un feto o ii) un animal viable o iii) poblaciones celulares pluripotentes.

Aunque el procedimiento es aplicable a todas las especies de mamíferos, las especies preferidas son ovejas, ganado vacuno (vacas y toros), cabras, cerdos, caballos, camellos, conejos, roedores y seres humanos. La presente invención no se refiere a clonación reproductora humana. Cubra células de tejidos humanos y, cuando sea aplicable, embriones humanos, en particular, embriones de menos de 14 días de edad.

Preferiblemente, la modificación génica dirigida se realiza en, o cerca de, un locus génico que se transcribe activamente, o es capaz de otro modo que soportar la modificación génica dirigida a elevada frecuencia. También se prefiere el uso de un sistema eficaz de transfección mediado por lípidos, por ejemplo, “GenePorter” (Gene Therapy Systems). También se prefiere el uso de un ADN vector de modificación génica dirigida en forma superenrollada o circular. Pueden incluirse largas regiones de homología al locus diana en el vector. Combinaciones de estos procedimientos preferidos de modificación génica dirigida están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, en una realización particularmente preferida, el uso de un sistema de transfección mediado por lípidos en combinación con un vector de modificación génica dirigida en forma circular (relajada y/o superenrollada) puede conseguir una modificación génica dirigida eficaz en los loci génicos que se transcriben escasamente o están inactivos en la célula hospedadora.

Muchos tipos de células somáticas son capaces de soportar la transferencia nuclear y por tanto son adecuadas de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, células epiteliales mamarias, células musculares, fibroblastos fetales, fibroblastos adultos, células epiteliales del oviducto, células de la granulosa y células del cumulus). Muchos otros tipos celulares también soportarán la transferencia nuclear, incluyendo las células madre embrionarias y sus derivados diferenciados, células endoteliales y células sub-endoteliales. La modificación génica dirigida de células somáticas en combinación con transferencia nuclear permite más flexibilidad que la modificación génica dirigida usando células ES solas. Las células ES son único tipo celular que presenta un patrón único de expresión génica. La amplia elección de células somáticas disponible para transferencia nuclear permite elegir un tipo celular para modificación génica dirigida en el que el locus génico de interés está preferiblemente activo transcripcionalmente, o es capaz de soportar

la modificación génica dirigida a elevada frecuencia. Por tanto, puede maximizarse la frecuencia de recombinación homóloga.

Esta estrategia puede extenderse para incluir la inducción artificial de expresión génica o la inducción de cambios en la cromatina en un tipo de célula somática para posibilitar o aumentar la frecuencia de modificación génica dirigida. La inducción de cambios en la cromatina puede implicar el uso de agentes que inhiben la desacetilación de histonas (por ejemplo, butirato sódico o trichostatina A) para inducir una configuración de cromatina abierta y/o la expresión génica en el locus diana antes de la modificación génica dirigida.

#### *Expresión génica y acetilación de histonas*

Hay sólidas evidencias de que la actividad génica está correlacionada con la acetilación de las centrales (revisado por Jeppeson, Bioessays, 19, 67-74, 1997; Pazin y Kadonaga, Cell 89, 325-328, 1997) y que la desacetilación de histonas regula la actividad transcripcional de los genes (Wolffe, Science 272, 371-372, 1996). Se han dilucidado los mecanismos detallados de represión que implican proteínas con actividad histona desacetilasa para varios genes (por ejemplo, Brehm y col., Nature 391, 597-601, 1998; Magnagi-Jaulin y col., Nature 391, 601-604, 1998; Iavarone y col., Mol Cell Biol 19, 916-922, 1999). La inhibición de la actividad histona desacetilasa por reactivos químicos tales como butirato sódico, o trichostatina A ha demostrado reactivar los genes silenciosos (Chen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5798-5803, 1997) e inhibir la represión transcripcional (Brehm y col., Nature 391, 597-601, 1998; Magnagi-Jaulin y col., Nature 391, 601-604, 1998). El efecto de los inhibidores de la histona desacetilasa sobre la frecuencia de la modificación génica dirigida no se ha descrito en la técnica.

Como alternativa, pueden activarse genes o clases de genes particulares usando activadores de la transcripción particulares. Dichos activadores de la transcripción pueden llamarse "factores". Por ejemplo, Weintraub y col. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86, 5434-5438, 1989) muestran que los fibroblastos primarios humanos y de rata, cuando se transfectan con el activador transcripcional, MyoD, activan una diversidad de genes musculares, y en el caso de células de rata, pueden formar miotubos. Asimismo, Tontonoz *et al* (Cell, 79, 1147-1156, 1994) ha mostrado que los reguladores PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  sinergizan para promover de forma potente la adipogénesis en fibroblastos. En el contexto de los protocolos descritos en este texto, la modificación dirigida en genes que están normalmente activos en las células musculares o adiposas puede realizarse por la introducción del tipo de factores descritos anteriormente. Sin embargo, es importante que el procedimiento usado para introducir un factor de transcripción no comprometa la capacidad para las células de soportar la transferencia nuclear.

La expresión de factores de transcripción puede conseguirse por transfección transitoria de una construcción de expresión antes de la modificación génica dirigida. Como solamente una pequeña proporción de las células transfectadas de forma transitoria realmente integra el ADN exógeno en su genoma, puede expresarse un activador de la transcripción diseñado para realizar la activación de un gen en el locus diana antes de la modificación génica dirigida y en la mayoría de las células no dejará ADN integrado. La presencia o ausencia de ADN de la construcción activadora de la transcripción integrado puede determinarse en clones individuales y aquellos que carecen de copias integradas pueden usarse para transferencia nuclear. Cuando sea necesario, las copias integradas de las construcciones de expresión activadoras de la transcripción pueden eliminarse si están flanqueadas por sitios de reconocimiento para enzimas recombinasas específicas de sitio, por ejemplo, los sitios loxP para la Cre o los sitios FRT para la FLP recombinasa (Kilby y col., Trends in Genetics, 9, 413-421, 1993).

La elección del locus diana puede hacerse en base a la capacidad para ese locus de soportar la modificación génica dirigida a elevada frecuencia, o en base a la función del gen. La modificación génica dirigida en el locus diana puede realizarse de modo que la expresión del gen diana se reduzca o se elimine, aumente, o quede sin afectar. La modificación génica dirigida no tiene que afectar necesariamente a la función del gen diana, de hecho en algunas circunstancias puede ser preferible que la expresión y función del locus diana se deje sin afectar.

La modificación génica dirigida de células somáticas primarias se realiza para conseguir la inactivación génica, regulación positiva génica, modificación génica, reemplazo génico, o colocación de transgenes en el locus diana. Ejemplos de loci diana y modificaciones preferidos incluyen, aunque sin limitación:

#### 1. inactivación, eliminación o modificación:

- de genes responsables de la presencia de antígenos que son xeno-reactivos para seres humanos (por ejemplo,  $\alpha$ -1,3 galactosiltransferasa),
- del locus PrP responsable de la producción de la proteína prión y su equivalente normal en animales no humanos,
- de genes que en seres humanos son responsables de enfermedades genéticas y que en forma modificada, inactivada o delecionada podrían proporcionar un modelo de esa enfermedad en animales, por ejemplo, el gen regulador de la conductancia transmembrana en fibrosis quística,
- de regiones reguladoras o genes para alterar la expresión de uno o más genes, por ejemplo, los genes transactivadores RFX que son responsables de la regulación de las moléculas de histocompatibilidad principal clase II

## ES 2 338 631 T3

- de secuencias virales endógenas

- de genes responsables de sustancias que provocan intolerancia o alergia a alimentos,

5 - de genes responsables de la presencia de restos carbohidratos particulares en glucoproteínas, por ejemplo, el gen de la ácido citidina monofosfo-N-acetil neuramínico hidroxilasa en animales no humanos

- de genes responsables del reordenamiento somático de los genes de inmunoglobulina, por ejemplo RAG1, RAG2

10

2. regulación positiva:

- de genes responsables de la supresión de la lisis mediada por el complemento (por ejemplo, CD59 porcino, DAF, MCP)

15

- de la expresión génica por la introducción de un elemento de respuesta para permitir la modulación experimental de la expresión génica

20

3. reemplazo génico:

- reemplazo de genes responsables de la producción de constituyentes sanguíneos (por ejemplo, albúmina sérica) por su equivalente humano,

25

- reemplazo de genes responsables de sustancias que provocan intolerancia o alergia a alimentos por un equivalente más benigno (por ejemplo, humano)

- reemplazo de genes de inmunoglobulina por su equivalente humano,

30

- reemplazo de genes responsables de antígenos de superficie por su equivalente humano.

4. colocación de transgenes en un locus predeterminado:

35

- colocación de un transgén en un locus génico que puede ofrecer expresión transgénica ventajosa

- colocación de un transgén en un sitio que lo coloca bajo el control de una región reguladora endógena.

40

El vector de modificación génica dirigida y el procedimiento experimental está diseñado de modo que se minimiza el tiempo que se necesita para identificar, aislar, analizar y expandir clones celulares primarios que portan acontecimientos dirigidos. Esto es un aspecto importante de la invención porque la reducción del tiempo en cultivo aumenta la probabilidad de que las células usadas como donantes nucleares sean viables, normales y euploides. Los riesgos reconocidos asociados con el cultivo *in vitro* de células primarias que son perjudiciales para el resultado de la transferencia nuclear incluyen: senescencia debido a la vida limitada, adquisición de daño genético, pérdida de un complemento normal de cromosomas y erosión rápida de los telómeros cromosómicos.

45

Las precauciones que puede tomarse opcionalmente para minimizar el tiempo en cultivo son:

50

1. Crioconservación de muestras celulares destinadas para su uso como donantes nucleares en la fase más temprana posible.

2. El uso de un vector de modificación génica dirigida que permite la selección directa o identificación de recombinantes homólogos con relación a los integrantes aleatorios.

55

3. El uso de condiciones de cultivo diseñadas para reducir las lesiones metabólicas sufridas por las células primarias. Por ejemplo, por el uso de una atmósfera reducida en oxígeno, o la inclusión de antioxidantes para minimizar el grado de daño oxidativo. Sin embargo, la invención no se limita al uso de dichas condiciones.

60

El uso de estrategias de captura de promotor, o captura de poliadenilación (revisadas por Hasty y Bradley En: Gene targeting: a practical approach. Ed Joyner, A.L. IRL press Oxford, 1992) son realizaciones preferidas de la invención. En cada caso, el vector de modificación génica dirigida está diseñado de tal modo que la recombinación homóloga entre el vector de modificación génica dirigida y el locus diana vuelva al gen marcador activo, mientras que en la mayoría de los integrantes aleatorios está inactivo. Los genes marcadores pueden incluir genes que confieren resistencia a fármacos (por ejemplo, neomicina, G418, higromicina, zeocina, blastidina, histidinol) u otros marcadores de selección (por ejemplo, HPRT, gpt), marcadores visibles (por ejemplo, GFP) u otros sistemas de selección (por ejemplo, sistemas de anticuerpo de cadena sencilla/hapteno; Griffiths y col., Nature 312, 271-275, 1984). A la inversa, puede diseñarse estrategias de modo que la recombinación homóloga provoque la eliminación de un gen marcador de

65

selección negativa. Por ejemplo, podría diseñarse un vector de modo que en células dirigidas correctamente se active un gen de recombinasa específica de sitio, por ejemplo, la Cre o FLP recombinasa (Kilby y *col.*, Trends in Genetics, 9, 413-421, 1993), por ejemplo, por una captura de promotor o poliadenilación, y la recombinasa provoca la delección de un gen de toxina flanqueado por los sitios de reconocimiento apropiados (por ejemplo, sitios *loxP* o FRT).

El vector de modificación génica dirigida está diseñado para maximizar la frecuencia de acontecimientos de modificación dirigida homóloga con relación a los de integración aleatoria. Esto se consigue incorporando grandes regiones de ADN homólogo al locus diana en el vector de modificación génica dirigida. Aunque es deseable maximizar el tamaño de estas regiones homólogas, en la práctica éstas están limitadas por las restricciones de producción de construcciones y la necesidad de una exploración genética fiable y simple (por ejemplo, por amplificación por PCR) para identificar acontecimientos dirigidos. El ADN homólogo en el vector de modificación génica dirigida puede ser, o no, isogénico a la célula hospedadora, porque puede obtenerse, o no, de la célula hospedadora, o de otras células del mismo individuo.

La modificación génica dirigida puede realizarse de tal modo que se cointegre un transgén con un gen marcador de selección en el locus diana. Esto podría usarse para proporcionar un sitio adecuado para conseguir elevada expresión del transgén. Una realización preferida de la invención es la colocación de un transgén diseñado para expresar una proteína foránea en la leche de un animal transgénico en un locus conocido, o que se prevé que va a soportar la expresión abundante en la glándula mamaria. Esto puede conseguirse, por ejemplo, colocando un gen estructural adyacente al promotor endógeno de un gen de la proteína de la leche. Otro ejemplo es la colocación de un gen adyacente al promotor endógeno de un gen de colágeno. Cuando es indeseable la presencia del gen marcador en el animal final, puede eliminarse por la acción de sistemas de recombinación específicos, por ejemplo, el sistema Cre/*loxP* o el sistema FLP/FRT (Kilby y *col.*, *Supra*) si está flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinación. La eliminación del gen marcador puede conseguirse en las células antes de la transferencia nuclear, o en células obtenidas de animales (incluyendo fetos) producidos por transferencia nuclear, o en ovocitos, cigotos, o embriones que portan la modificación genética y son de un linaje que se inició con un animal creado por transferencia nuclear o durante la copulación posterior de animales obtenidos por transferencia nuclear. Un procedimiento por el que puede activarse específicamente la Cre recombinasa y usarse para realizar la recombinación durante la producción de gametos masculinos se ha descrito por O’Gorman y *col.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 14602-14607, 1997).

Pueden realizarse múltiples rondas de modificación génica dirigida, en células antes de la transferencia nuclear o en células obtenidas de un animal producido por transferencia nuclear. La remodelación dirigida de un locus puede facilitarse por la inclusión de un gen marcador en la primera ronda de modificación dirigida de modo que su pérdida en una posterior modificación dirigida permita la rápida identificación o selección de clones que portan posteriores acontecimientos dirigidos.

Como se ha indicado anteriormente, una parte de la presente invención proporciona la generación de animales que contienen modificaciones dirigidas en sus genomas. No todas las regiones del genoma son sitios adecuados para su modificación a causa de su proximidad a elementos de silenciamiento génico tales como los observados en heterocromatina y porque la modificación en ciertos sitios puede tener efectos destructivos sobre la expresión génica endógena. Estas consecuencias indeseables potenciales pueden examinarse en cualquier animal resultante del proceso de transferencia nuclear, particularmente los homocigóticos en el locus (loci) diana. Esto puede conseguirse por cruce reversivo o usando donantes nucleares donde no se ha conseguido el mismo acontecimiento de modificación dirigida en ambos alelos. Se ha reivindicado que una proporción significativa de una realización preferida de la invención es la validación de loci diana como sitios preferidos para modificación genética a causa de la ausencia de daño genético colateral y su capacidad de conferir buenos niveles de expresión de transgenes evaluados en animales de transferencia nuclear. Dicha validación sería extremadamente valiosa para los que contemplan la terapia génica *ex vivo*.

#### Terapia génica *ex vivo*

La terapia génica *ex vivo* es un medio para suministrar productos génicos terapéuticos a un paciente en el que las células obtenidas por biopsia, se manipulan *in vitro* y después se devuelven al mismo paciente. La terapia génica por trasplante de células modificadas genéticamente *ex vivo* se ha usado para el suministro tanto local como sistémico de proteínas a animales experimentales. Por ejemplo, Hortelano y *col.*, (Human Gene Therapy 10, 1281-8, 1999) y Regulier y *col.*, (Gene Therapy 5, 1014-1022, 1998) describen el trasplante en ratones de mioblastos que expresan el Factor IX de coagulación humano y la eritropoyetina respectivamente. Cao y *col.* (J. Mol Med 76, 782-789, 1998) y Muller-Ladner y *col.* (Arthritis. Rheum. 42, 490-497, 1999) describen el trasplante en ratones de fibroblastos que expresan citoquinas e inhibidores de citoquinas respectivamente.

Hasta la fecha, la elección de la célula usada para la terapia génica *ex vivo* está dictaminada por su disponibilidad a partir del paciente, la facilidad con que puede realizarse la manipulación genética, etc. Si estuvieran disponibles células madre adultas más fácilmente, estas proporcionarían dianas adecuadas para la manipulación génica, a causa de sus capacidades para formar una población auto-sostenible o porque pueden inducirse a diferenciarse *in vitro* en un tipo celular de difícil acceso en el paciente, por ejemplo, neuronas (véase, Smith, Current Biology R802-804, 1998). Más recientemente, ha habido propuestas de que podría obtenerse un objetivo similar usando clonación terapéutica (Tounson y Pera Reprod Fert 10 121-125 1998). La clonación terapéutica es una aplicación hasta ahora no probada de transferencia nuclear que asegura la provisión de células, tejidos, y órganos para un paciente humano que

requiere el reemplazo o la complementación de tejido enfermo o dañado. En resumen, se obtienen células somáticas por biopsia, se transfieren sus núcleos en un ovocito, se obtienen blastocistos humanos y se usan para producir células madre embrionarias (ES), u otras células pluripotentes, que después se introducen para diferenciarlas en el tipo celular requerido para el trasplante. Si las células donantes nucleares se obtienen del paciente que requiere el trasplante, esto proporcionaría un injerto autólogo. Preferiblemente, la modificación génica dirigida se realizaría sobre la población donante somática antes de la clonación terapéutica ya que todas las células del embrión disgregado tendrían la alteración deseada minimizando de este modo el tiempo necesario en cultivo para expandir poblaciones celulares antes del trasplante.

#### Modificación génica de células destinadas para trasplante humano

Aunque, en algunos casos, bastarían células sanas sin manipular, la función y eficacia de tejido producido por clonación terapéutica, o terapia génica *ex vivo* requeriría, o se potenciaría por modificación génica. La modificación génica podría usarse para realizar cambios en genes endógenos genes *in situ*, por ejemplo, para reparar o eliminar un defecto genético, o para añadir un transgén. Los transgenes pueden añadirse para conseguir una diversidad de objetivos terapéuticos, cuya naturaleza precisa dependería de la afección a tratar y las células a transplantarse. Por ejemplo, podría diseñarse un transgén para:

- ayudar a la longevidad de las células transplantadas
- ayudar a la interacción de las células transplantadas con el tejido hospedador
- ayudar a la diferenciación terminal de las células precursoras transplantadas
- inducir la regeneración del tejido hospedador, por ejemplo, por expresión de un factor de crecimiento
- expresar un factor que es deficiente, está ausente o es sub-funcional en el paciente
- facilitar la eliminación controlada de las células transplantadas si se requiere
- actuar como fuente de agente tóxico para las células cercanas al sitios de trasplante, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer.

Aunque la realización de cambios en los genes endógenos solamente puede conseguirse por modificación génica dirigida, la adición de transgenes puede conseguirse por integración aleatoria, o modificación génica dirigida. Sin embargo, la modificación génica dirigida ofrece varias ventajas importantes sobre la integración aleatoria como medio para añadir un transgén a células destinadas para trasplante humano.

Los transgenes integrados de forma aleatoria en un genoma hospedador están sometidos al “efecto de posición” bien documentado. Esto puede conducir a una expresión transgénica sub-óptima y puede someter al transgén a influencias capaces de alterar el patrón tisular o temporal de la expresión génica y que son necesariamente impredecibles. En contraste, la modificación génica dirigida permite la colocación precisa de un transgén en un locus predeterminado que puede elegirse para proporcionar características de expresión deseables.

La integración de un transgén en algunos sitios en el genoma hospedador puede alterar físicamente secuencias génicas estructurales, o conducir a una regulación positiva o negativa aberrante de la expresión génica endógena. La integración aleatoria, por lo tanto, tiene el riesgo de causar un fenotipo pernicioso en la célula hospedadora, incluyendo tumorigénesis. La modificación génica dirigida, sin embargo, permite la colocación de un transgén en un sitio predeterminado que puede elegirse en base a su seguridad en este aspecto.

Aunque la frecuencia de modificación génica dirigida en células somáticas generalmente se considera muy bajo en comparación con la frecuencia de la integración aleatoria, en esta memoria descriptiva de patente se demuestra que una combinación apropiada de locus diana, tipo celular hospedador y vector de modificación dirigida puede conducir a una frecuencia muy elevada de modificación dirigida.

Los criterios deseables para un locus diana para la colocación de transgenes, por lo tanto, pueden resumirse del siguiente modo:

1. El locus debe soportar la expresión de transgenes a niveles abundantes si se requiere.
2. El locus no debe influir excesivamente en la regulación específica de tejido del transgén.
3. La integración del transgén en el locus diana debe tener un efecto mínimo o ausente sobre el fenotipo celular.
4. El locus diana debe soportar la modificación génica dirigida a elevada frecuencia, preferiblemente en células que se obtienen fácilmente por biopsia y que pueden cultivarse, transfectarse y seleccionarse con fármacos. Es deseable una



elevada frecuencia de modificación génica dirigida ya que simplifica los procedimientos experimentales y minimizaría la cantidad de tejido requerido del paciente por biopsia y minimizaría el tiempo necesario para el cultivo *in vitro*.

Nuestros descubrimientos, descritos completamente en los ejemplos, indican que el locus COLIA1 representa un ejemplo de un buen locus diana en estos aspectos.

Una aplicación principal de terapia génica *ex vivo* es el uso de células transplantadas modificadas genéticamente como medio para proporcionar una proteína carente en el paciente, por ejemplo, factores de coagulación sanguínea para pacientes hemofílicos. Un objetivo principal de la manipulación genética de dichas células es conseguir un nivel adecuado de expresión del producto terapéutico en las células transplantadas. Esto puede realizarse por la colocación de un transgén como unidad de transcripción aislada en un locus diana bajo el control de un promotor óptimamente activo en el tipo celular en el que se desea la expresión del transgén. Sin embargo, un enfoque alternativo es colocar el transgén bajo el control de un promotor génico endógeno, un promotor que dirige una expresión abundante en el tipo celular transplantado sería particularmente adecuado para la expresión de una proteína requerida en grandes cantidades o cuando está restringida la cantidad de células transplantadas en el paciente. Por ejemplo, el promotor endógeno puede dirigir la expresión en células fibroblásticas o en células endoteliales. El transgén puede colocarse bajo el control del promotor endógeno sin alterar la expresión del gen endógeno insertando la secuencia transgénica dentro de la región no traducida 3' del ARNm de modo que forme parte de un mensaje bicistrónico. La traducción de la región codificante del transgén puede conseguirse por inserción de un sitio de entrada interno de ribosomas. La colocación satisfactoria de un transgén marcador como parte del ARNm de COLIA1 se describe en los ejemplos.

#### *Transferencia nuclear como ensayo de la normalidad celular después de la modificación génica dirigida*

Un aspecto importante de la presente invención es la demostración de que pueden obtenerse animales normales viables por transferencia nuclear a partir de clones celulares que han experimentado colocación de transgenes por modificación génica dirigida en el locus COLIA1.

La producción de un animal por transferencia nuclear proporciona un ensayo muy estricto de la normalidad de la célula donante. Por tanto, la transferencia nuclear en animales tales como ovejas proporciona un medio riguroso para ensayar los procedimientos de modificación génica dirigida antes de que se realicen en células humanas destinadas para terapia de trasplante. Se ha identificado que la modificación génica dirigida y la transferencia nuclear en animales tales como las ovejas ofrecen un medio para identificar loci diana adecuados para la modificación génica dirigida humana. La importancia de la transferencia nuclear en una especie animal particular como ensayo de la seguridad de un locus humano equivalente sería máxima en regiones en las que existe un elevado grado de similitud entre el genoma humano y animal.

Los medios para identificar los loci diana humanos adecuados para la colocación de transgenes y esos loci diana se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Como podrían usarse los mismos loci para colocar diferentes transgenes en una gama de aplicaciones terapéuticas, puede caracterizarse adicionalmente una serie de loci diana candidatos identificados por transferencia nuclear animal, por ejemplo, en cultivo celular humano antes de que se usen para terapia humana.

Esta información puede aplicarse a la elección del sitio de modificación dirigida para terapia génica. Cualquiera que sea la elección del tipo celular usado, será imperativo que la población usada tenga toda ella la misma modificación preseleccionada. Esto implicará clonación celular a partir de tipos de células madre o diferenciadas primarias modificadas correctamente. Cuando se usa clonación terapéutica, todas las células, en origen, tendrán el mismo genotipo.

Todas las características preferidas de cada aspecto de la invención se aplican a todos los demás aspectos *mutatis mutandis*.

Se hace referencia a los siguientes dibujos en el presente texto:

55

#### **Leyendas de las figuras**

Figura 1

60 Estructura del vector de modificación génica dirigida COLT-1 y el locus COLIA1 ovino dirigido.

La parte superior muestra un diagrama del vector COLT-1 con las regiones 5' y 3' homólogas al locus COLIA1 ovino, la región IRES neo y el plásmido bacteriano indicados.

65 Un acontecimiento de doble entrecruzamiento en el locus COLIA1 ovino (centro) produce la estructura del locus dirigido indicada en la parte inferior de la Figura. Aunque no es posible determinar los sitios precisos en los que sucede recombinación entre el vector COLT-1 y el locus diana, las regiones en el locus diana homólogas al vector COLT-1 se muestran con sombreado más oscuro.

## ES 2 338 631 T3

Figura 2

Estrategia de exploración por PCR usada para identificar acontecimientos de modificación génica dirigida en el locus COLIA1 ovino.

La parte superior muestra la posición aproximada de los dos cebadores para amplificar un fragmento de 3,4 kb desde una región única para el vector COLT-1 hasta una región única para el locus COLIA1.

La secuencia A muestra una parte de la secuencia de ADN que abarca la unión entre la región única para el locus COLIA1 y la región 5' de homología compartida con el vector COLT-1. Se muestra la posición y orientación del cebador COLTPCR4.

La secuencia B muestra una parte de la secuencia de ADN que abarca la unión entre el gen IRES neo y la región 5' de homología compartida. Se muestra la posición y orientación del cebador COLTPCR8.

Figura 3

Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de PCR amplificados a partir de clones celulares PDFF-2 resistentes a G418 transfectados con COLT-1. Se indican los carriles que contienen las muestras de los clones celulares 1, 2, 6, 12, 13, 14, y 26. La posición del fragmento amplificado de diagnóstico de 3,4 kb se indica por la flecha.

Figura 4

Análisis de secuencia de la unión 5' del locus COLIA1 ovino dirigido en tres clones celulares dirigidos obtenidos independientemente.

La parte superior muestra la secuencia del extremo 5' del vector de modificación génica dirigida COLT-1 linealizado. Se indica la secuencia terminal derivada de un vector de clonación.

La parte central muestra una parte de la secuencia del fragmento de diagnóstico de 3,4 kb amplificado a partir de cada uno de los clones celulares dirigidos 6, 13 y 14 que abarcan la unión entre la región única para el locus COLIA1 y la región 5' de homología compartida con el vector COLT-1.

La parte inferior muestra la secuencia del locus COLIA1 de PDFF2 sobre la misma región.

Figura 5

Construcción del vector de colocación de transgenes COLT-2.

La parte superior del diagrama muestra la estructura del transgén AAT dirigido por BLG insertado en el vector COLT-1. El centro muestra el vector COLT-1 y el punto en el que se insertó el transgén AATC2. La parte inferior del diagrama muestra la estructura del vector COLT-2. Las regiones funcionales de cada construcción se distinguen por patrones y sombreado y son como se indica.

Figura 6

Análisis tipo Southern de corderos con modificación génica dirigida en COLIA1.

Los carriles indicados en la clave contienen ADN genómico de corderos obtenidos por transferencia de núcleos desde clones celulares dirigidos por COLT-1 (PDCOL6) y COLT-2 (PDCAAT90), muestras de ADN control de un cordero normal, el clone celular PDCAAT90 y células PDFF2 no transfectadas. Las posiciones del fragmento de 7 kb obtenido del locus COLIA1 no dirigido y el fragmento de 4,73 kb derivado del locus COLIA1 dirigido se indican por flechas.

Figura 7

Se muestra la estructura del locus COLIA1 ovino y los vectores de modificación dirigida COLT-1 y 2 y los loci dirigidos por COLT-1 y 2.

El diagrama del locus COLIA1 muestra la posición de los sitios de parada de la traducción y de poliadenilación y la dirección de la transcripción de COLIA1 como una flecha. El asterisco muestra la posición del sitio de restricción SspI donde se hicieron las inserciones génicas dirigidas. Se muestra la posición de la sonda COLIA1 usada para el análisis tipo Southern en las Figuras 6 y 8.

El casete IRES neo se indica por un recuadro sombreado, el vector bacteriano pSL1180 se indica por un recuadro transparente y el transgén AAT dirigido por BLG por un recuadro a rayas. Los diagramas de los loci dirigidos muestran la dirección y extensión predicha del mensaje bicistrónico COLIA1/IRES neo y también el mensaje AAT en forma de flechas.

La escala del diagrama se indica por la barra de escala de 2 kb. Los sitios de enzimas de restricción mostrados son: K, KpnI; A, AspI; Sc, SacII; S, SalI; B, BamHI.

## Figura 8

Análisis tipo Southern de clones celulares transfectados con COLT-2 (PDCAAT).

La identidad de cada clon celular se muestra por encima de cada carril. Se indican los que proporcionan una señal positiva por PCR. También se incluyen células PDFF-2 no transfectadas. Las posiciones del fragmento de 7 kb derivado del locus COLIA1 no dirigido y el fragmento de 4,73 kb derivado del locus COLIA1 dirigido se indican por flechas.

## Figura 9

Análisis tipo Northern del ARN total derivado de los clones celulares PDCAAT 81 y 90 y células PDFF-2 no transfectadas.

La fuente de cada muestra de ARN se indica sobre cada carril. La autorradiografía superior izquierda muestra la hibridación con una sonda de neomicina fosfotransferasa (neo), la autorradiografía superior derecha muestra la hibridación con una sonda de COLIA1 humana. Los dos paneles inferiores muestran la hibridación con una sonda de  $\beta$ -actina de ratón. Se indica la posición de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S.

## Figura 10

Análisis tipo Northern de células epiteliales mamarias ovinas primarias (POME) en cultivo.

Se cultivaron células POME durante un total de 4 y 9 días en cultivo en placas recubiertas con fibronectina (FN) o colágeno tipo I. Las células se cultivaron de forma continua en Medio de Proliferación (no inducido) o se cultivaron durante los tres días finales antes de la recolección en Medio de Inducción (inducido). El ARN total se extrajo y se sometió a análisis tipo Northern usando procedimientos convencionales. La autorradiografía muestra el resultado de la hibridación con una sonda de lactoglobulina beta (BLG) ovina. La fuente de cada ARN se indica por encima de cada carril. También se incluye el ARN total preparado a partir de la glándula mamaria de la que se obtuvieron las células. El tamaño y la posición del ARNm de BLG ovina se indican por la flecha.

## Figura 11

Se muestran la estructura del locus de la lactoglobulina beta (BLG) ovina y el vector de modificación dirigida BLAT-3.

El diagrama del locus BLG muestra la posición de los sitios de inicio de la traducción (ATG), parada y poliadenilación de BLG y la dirección de la transcripción desde el promotor de BLG. Los exones se indican por recuadros negros. El exón 3 en el que está diseñado que tenga lugar la inserción dirigida está marcado. Se indica la posición de los cebadores usados para amplificar por PCR un fragmento desde el locus dirigido. Las regiones 5' y 3' del vector.

BLAT-3 homólogas al locus BLG ovino están marcadas. El casete IRES neo está indicado por un recuadro sombreado y el vector bacteriano pBS (Bluescript) está indicado por un recuadro transparente. La escala del diagrama está indicada por la barra de escala de 2 kb.

## Figura 12

Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de PCR amplificados a partir de clones de células POME resistentes a G418 transfectadas con BLAT-3. Se indican los carriles que contienen muestras de los clones 1-16 de células POME transfectadas con BLAT-3. También se incluye un fragmento amplificado a partir de un plásmido construido para imitar la estructura 5' del locus BLG dirigido con BLAT-3, marcado como "control positivo". También se indican células POME no transfectadas. La posición del fragmento de diagnóstico de 2,375 kb se muestra por la flecha.

Figura 13

Mapa esquemático del vector knockout pPL501 y 502 de captura de promotor de  $\alpha 1,3$  GT porcino. La estructura genómica de la  $\alpha 1,3$  GT porcina se basó en el informe de Katayama y *col.* (Katayama, A y *col.*, Glycoconjugate J, 15, 583-589, 1998). El gen es de 24 kb de tamaño, y contiene 6 exones y 5 intrones. El codón de inicio está localizado en el exón 4.

Figura 14

Resumen de la estrategia de exploración por PCR para la detección de acontecimientos de recombinación homóloga en el locus  $\alpha 1,3$  GT porcino. Las flechas pequeñas indican las posiciones de los dos cebadores de PCR. El fragmento de PCR de 2,4 kb subclonado se secuenció desde ambos extremos.

Figura 15

Análisis de secuencia sobre la región de unión 3' del fragmento de PCR amplificado a partir de clones celulares dirigidos de  $\alpha 1,3$  GT porcina.

La parte superior muestra la secuencia de la parte de los vectores de modificación génica dirigida pPL501 y 502 circulares en el extremo 3' del brazo homólogo 3' de cada uno. Se indica la unión entre la región 3' de homología con el gen de la  $\alpha 1,3$  GT porcina y la secuencia plasmídica bacteriana.

La parte inferior muestra la secuencia del fragmento de diagnóstico de 2,65 kb amplificado a partir de cuatro clones celulares dirigidos que abarcan la unión entre la región única para el locus 1,3-GT y la región 3' de homología compartida con el vector de modificación génica dirigida de  $\alpha 1,3$ -GT. La secuencia derivada de cada clon era idéntica.

Figura 16

Mapa esquemático del vector knockout de captura de poli-A de BLG bovina. El brazo de recombinación homóloga 5' es un fragmento de 10 kb del promotor de BLG. El brazo de recombinación homóloga 3' es un fragmento de 1,9 kb que contiene del exón 2 al intrón 3 de BLG.

Figura 17

Exploración por PCR y secuenciación de ADN de clones knockout de BLG. El cebador 5', Neo442s, se localiza en el extremo 3' del gen neo. El cebador 3', BLG3'1, está aproximadamente 260 pb 3' del extremo 3' del brazo homólogo 3'. El producto de PCR a partir del locus dirigido es de 2,3 kb.

Figura 18

Análisis de secuencia sobre la región de unión 3' del fragmento de PCR amplificado a partir de tres clones celulares dirigidos de BLG bovina.

La parte superior muestra la secuencia de la parte del vector de modificación génica dirigida pPL522 circular en el extremo 3' del brazo homólogo 3' de cada uno. Se indica la unión entre la región 3' de homología con el gen de BLG bovina y la secuencia plasmídica bacteriana.

La parte inferior muestra la secuencia del fragmento de diagnóstico de 2,3 kb amplificado a partir de tres clones celulares dirigidos que abarcan la unión entre la región única para el locus BLG y la región 3' de homología compartida con el vector de modificación génica dirigida de BLG. La secuencia derivada de cada clon era idéntica.

Figura 19

Transferencia de Western de muestras de leche para identificar la presencia de AAT transgénico.

Figura 20

Gráfico de cambios en la expresión de AAT transgénico sobre el transcurso del ordeñado de muestras.

Figura 21

Visión general de la metodología de transferencia nuclear doble.

Los inventores han demostrado la modificación génica dirigida en tres loci génicos en tres especies. En cada caso, la frecuencia de modificación génica dirigida conseguida estaba significativamente en exceso de la tasa que podría esperarse en células primarias en base a los datos publicados.

El locus COLIA1 de oveja se ha modificado de forma dirigida para la colocación de un gen marcador de selección solo y en combinación con un transgén. El gen COLIA1 expresa el gen del procolágeno alfa-1 (I) a elevado nivel en las células fibroblásticas usadas para la modificación dirigida. La frecuencia de modificación génica dirigida obtenida con el gen marcador era ligeramente mayor que 1 acontecimiento dirigido por 10 clones celulares resistentes a fármaco. Esto está significativamente en exceso de la tasa de modificación génica dirigida que podría esperarse en células primarias en base a los datos publicados. Además, se ha demostrado que las células que portan la modificación dirigida retenían su capacidad de soportar la transferencia nuclear y la producción de corderos viables. Esto, por lo tanto, facilita el uso práctico de células somáticas acoplado con transferencia nuclear como medio para la transferencia precisa de modificaciones genéticas predeterminadas causadas *in vitro* a animales completos.

El gen de la lactoglobulina beta de oveja se ha modificado de forma dirigida a elevada eficacia en células primarias elegidas porque proporcionan abundante expresión en el locus diana.

El gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa de cerdo se ha modificado de forma dirigida en fibroblastos primarios que se estimaba que se expresaría en el locus diana a bajo nivel. La modificación dirigida se consiguió usando un nuevo procedimiento de transfección adecuado para modificación génica dirigida en loci génicos que se transcriben a bajo nivel, o son inactivos en el tipo celular hospedador.

El gen de la lactoglobulina beta bovina se ha modificado de forma dirigida a elevada eficacia en fibroblastos primarios que no transcriben de forma detectable el locus diana, usando el mismo nuevo procedimiento de transfección.

La presente invención se ejemplifica por los siguientes ejemplos no limitantes.

#### Ejemplo 1

##### *Colocación de un gen marcador neo en el locus COLIA1 en células fibroblásticas fetales ovinas primarias por modificación génica dirigida*

El cultivo primario de fibroblastos fetales primarios de oveja Poll Dorset PDFF2 se ha descrito previamente (Schnieke y col., *Supra*). El ADN genómico de PDFF2 se usó para generar una biblioteca de fragmentos de ADN clonados a partir de la cual se aisló que un clon molecular correspondiente a una parte del gen COLIA1 ovino desde el exón 44 hasta aproximadamente 14 kb 3' del sitio de parada de la traducción. El clon molecular de COLIA1 ovino se usó como fuente de ADN para la construcción del vector de modificación génica dirigida COLT-1.

COLT-1 está diseñado para colocar el gen marcador de selección neo cadena abajo del gen COLIA1 sin alterar la expresión del gen COLIA1.

La modificación génica dirigida con el vector COLT-1 se diseñó para maximizar la frecuencia de recombinación homóloga en fibroblastos fetales PDFF2:

a. La elección del locus diana, el locus del gen COLIA1 se expresa elevadamente en fibroblastos.

b. La construcción COLT-1 se diseñó como captura de promotor de modo que la construcción sola no confiera resistencia a G418. La recombinación homóloga en el locus COLIA1 introduce un gen neo que carece de un promotor pero que tiene en el extremo 5' un sitio de entrada interno de ribosomas (IRES) para facilitar la traducción. La recombinación homóloga provoca la inserción del gen IRES neo en la región transcrita de COLIA1 cadena abajo del sitio de parada de la traducción de COLIA1. La transcripción del locus COLIA1 dirigido produce un mensaje bicistrónico en el que la traducción de la región codificante de neo sucede por el inicio en el sitio de entrada interno de ribosomas.

c. La longitud de las regiones de COLT-1 homólogas al gen COLIA1 se maximizó.

COLT-1 consta de:

Una región de 3 kb del extremo 3' del gen COLIA1 ovino, desde una posición aproximadamente 2,9 kb 5' del sitio de parada de la traducción hasta un sitio SspI 131 bases 3' del sitio de parada.

Una región de sitio de entrada interno de ribosomas (IRES) de 0,6 kb correspondiente a las bases 1247 a 1856 del vector IRES hygro (Clontech, número de acceso a Genbank: U89672) Una región de 1,7 kpb que contiene el gen neo bacteriano y una parte del extremo 3' del gen de la hormona del crecimiento humana que contiene el sitio de poliadenilación esencialmente igual al descrito por McWhir y col., (Nature Genetics 14, 223-226, 1996).

Una región de 8,3 kb del extremo 3' y la región flanqueante del gen COLIA1 ovino, desde un sitio SspI 131 bases 3' del sitio de parada de la traducción hasta un sitio XhoI aproximadamente 8,4 kb 3' del sitio de parada.

## ES 2 338 631 T3

### *El vector de clonación bacteriano pSL1180 (Pharmacia)*

La estructura del vector COLT-1 y el locus COLIA1 dirigido se muestran en la Figura 1. El ADN de COLT-1 linealizado con la exima de restricción Sall se introdujo por transfección en células PDFF2 de pase temprano y los clones celulares resistentes a G418 se aislaron como se resume a continuación:

- Día 0: Se transfectaron  $5 \times 10^5$  células PDFF2 en el pase 3 con  $6 \mu\text{g}$  de ADN de COLT-1 linealizado usando lipofectAMINA siguiendo el procedimiento recomendado por los fabricantes (Gibco, BRL Life Technologies).
- Día 2: Las células transfectadas se dividieron en dos series de ocho placas (10 cm) y se añadió G418 al medio a  $0,8 \text{ mg/ml}$ , o  $3,0 \text{ mg/ml}$ .
- Día 11-18: Las colonias se aislaron y se volvieron a sembrar en placas de 6 pocillos. Se tomaron muestras para análisis por PCR.
- Día 15-19: Las colonias se expandieron en matraces de  $25 \text{ cm}^2$ . Se tomaron muestras adicionales para análisis por PCR.
- Día 20-25: Los clones expandidos se crioconservaron.

De principio a fin, las células PDFF-2 se cultivaron en medio BHK 21 (Glasgow MEM) suplementado con L-glutamina ( $2 \text{ mM}$ ), piruvato sódico ( $1 \text{ mM}$ ) y suero bovino fetal al 10% en matraces y placas de cultivo tisular convencionales en una incubadora de cultivo tisular humidificada usando una atmósfera compuesta por  $\text{O}_2$  al 2%,  $\text{CO}_2$  al 5%,  $\text{N}_2$  al 93%. Las células se pasaron por tratamiento con tripsina convencional.

Se usó análisis por PCR para distinguir entre copias integradas de forma aleatoria de COLT-1 y recombinantes homólogos en el locus COLIA1. El esquema de PCR usado se muestra en la Figura 2. La parte superior de la Figura 2 muestra la estructura predicha del locus dirigido y las posiciones de los dos cebadores usados para amplificar un fragmento de  $3,4 \text{ kb}$  si el casete IRES neo se inserta en la posición correcta en el gen COLIA1. Las secuencias de ADN A y B, en la parte inferior de la Figura, muestran las posiciones precisas de cada cebador con relación a la estructura del locus dirigido.

Las muestras de células a explorar se lisaron en tampón de lisis de PCR ( $\text{KCl } 50 \text{ mM}$ ,  $\text{MgCl}_2 \text{ } 1,5 \text{ mM}$ , Tris  $10 \text{ mM}$  pH 8,5, NP40 al 0,5%, Tween al 0,5%) más proteinasa K, y se incubaron a  $65^\circ\text{C}$  durante 30 min. La proteinasa K se inactivó a  $95^\circ\text{C}$  durante 10 min. y se realizó reacción en cadena de la polimerasa usando el sistema de PCR con cebadores largos de gran expansión ("Expand long template PCR system") (Boehringer) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Las condiciones del ciclado término fueron las siguientes:

|              |      |                    |
|--------------|------|--------------------|
|              | 94°C | 2 min.             |
| 10 ciclos de |      |                    |
|              | 94°C | 10 s               |
|              | 55°C | 30 s               |
|              | 68°C | 2 min.             |
| 20 ciclos de |      |                    |
|              | 94°C | 10 s               |
|              | 60°C | 30 s               |
|              | 68°C | 2 min.+ 20 s/ciclo |
|              | 68°C | 7 min.             |

La Figura 3 muestra un electroferograma en gel de agarosa representativo de productos de PCR amplificados a partir de siete clones celulares resistentes a G418. Cuatro de estos (clones 6, 13, 14, 26) muestran la presencia del fragmento de diagnóstico de  $3,4 \text{ kb}$  indicativo de la integración del gen IRES neo en el locus COLIA1 por recombinación homóloga.

En total se analizaron 63 clones por PCR, 7 de los cuales (11%) eran positivos.

Se determinó la secuencia de nucleótidos de fragmentos amplificados de tres clones (6, 13, 14) y se comparó con la secuencia del gen COLIA1 ovino. Las partes de la secuencia del fragmento amplificado de cada clon se muestran en la Figura 4. Puede observarse que en cada caso, la secuencia del fragmento amplificado de cada clon es idéntica sobre la unión 5' del locus dirigido y es coherente con un acontecimiento de recombinación homóloga que sucede entre el plásmido COLT-1 y el gen COLIA1 endógeno. Es decir, el fragmento de PCR contiene la secuencia del gen COLIA1 5' de la presente dentro de la construcción COLT-1 y no contiene la secuencia que se sabe que está presente en el extremo 5' final de la construcción COLT-1 linealizada.

## Ejemplo 2

### *Generación de ovejas con modificación génica dirigida por COLT-1*

Se seleccionaron los clones 6 y 13 dirigidos para transferencia nuclear principalmente porque crecen más rápidamente en cultivo. El número de cromosomas de estos clones se determinó como un requisito básico para la competencia como donantes nucleares. En cada caso, el número de cromosomas global indicaba que cada clon era euploide.

La Tabla 2 muestra el número de cromosomas de los clones 6 y 13

| Clon | número de proliferaciones contadas | número de proliferaciones 53/54 <sup>1</sup> |
|------|------------------------------------|----------------------------------------------|
| 6    | 28                                 | 17                                           |
| 13   | 42                                 | 28                                           |

### 1 Número de proliferaciones con un recuento de cromosomas de 53 ó 54.

Se calculó que el periodo total de cultivo que estas células había experimentado desde la disgregación del feto original hasta el punto de preparar múltiples reservas criopreservadas listas para rondas de transferencia nuclear era de 30 días. Este periodo estaba compuesto por cuatro fases: 2 días y 3 días para el establecimiento inicial de la solución madre de trabajo de PDFF-2 de células primarias, 20 días, tiempo durante el cual se realiza la modificación génica dirigida, y 5 días para la expansión de los clones y proporcionar múltiples reservas para transferencia nuclear. Entre estas fases, las células se almacenan por criopreservación.

Las reservas criopreservadas de cada clon celular se descongelaron, se cultivaron durante 1-2 días, después se prepararon para transferencia nuclear del siguiente modo. Preparación de células para actuar como donantes nucleares.

Las células donantes se sembraron a  $2 \times 10^4$  células por pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos y se cultivaron durante 16-24 horas en medio BHK 21 (Glasgow MEM) suplementado con L-glutamina (2 mM), piruvato sódico (1 mM) que contenía suero bovino fetal al 10%. A las 24 horas, se aspiró el medio y la monocapa celular se lavó tres veces en medio que contenía suero bovino fetal al 0,5%. Los cultivos después se incubaron a 37°C en medio bajo en suero (0,5%) durante 2-5 días hasta que se hubo excitado el ciclo celular que se determina por tinción del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) en cultivos de control.

Las células se recogieron por tratamiento con tripsina y se almacenaron en suspensión en medio que contenía suero bovino fetal al 10% durante 2-3 horas antes de su uso como donantes nucleares.

### *Superestimulación de ovejas donantes y recuperación de ovocitos*

Las ovejas a actuar como donantes de ovocitos se sincronizaron con esponjas de progestágenos durante 14 días (Veramix, Upjohn, RU) y se indujeron a superovular con inyecciones únicas de 3,0 mg/día (total 6,0 mg) de hormona foliculoestimulante ovina (FSH) (Ovagen, Immunochemical Products Ltd. Nueva Zelanda) en dos días sucesivos. La ovulación se indujo con una dosis única de 8 mg de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH Receptal, Hoechst, RU.) 24 horas después de la segunda inyección de FSH.

Se recuperaron ovocitos en metafase II no fertilizados por lavado abundante del oviducto a las 24-29 horas después de la inyección de GnRH usando solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco que contenía suero bovino fetal (FCS) al 1,0% mantenido a 37°C hasta su uso.

## ES 2 338 631 T3

### *Manipulación de ovocitos*

Los ovocitos recuperados se mantuvieron a 37°C, se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con FCS al 1,0% y se transfirieron a medio M2 libre de calcio que contenía suero bovino fetal (FCS) al 10%, a 37°C. Para eliminar los cromosomas (enucleación), los ovocitos se colocaron en M2 libre de calcio que contenía FCS al 10%, 7,5 µg/ml de citocalasina B (Sigma) (la citocalasina B es opcional) y 5,0 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma) a 37°C durante 20 minutos. Después se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma desde directamente por debajo del primer cuerpo polar usando una pipeta de vidrio de 20 µM. La enucleación se confirmó exponiendo la parte aspirada del citoplasma a luz UV y comprobando la presencia de una placa metafásica.

### *Reconstrucción de embriones*

Se enuclearon grupos de 10-20 ovocitos y se colocaron en gotas de 20 µl de medio M2 libre de calcio a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% en aceite mineral (SIGMA). A las 32-34 horas después de la inyección de hCG, se puso una única célula en contacto con el ovocito enucleado. El pareado se transfirió a la cámara de fusión (véase a continuación) en 200 µl de manitol 0,3 M, MgSO<sub>4</sub> 0,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,001 mM en agua destilada. La fusión y la activación se indujeron por aplicación de un pulso de CA de 3 V durante 5 segundos seguido de 3 pulsos de CC de 1,25 kV/cm durante 80 µs. Después, los duplicados se lavaron en TC199 con FCS al 10% (la adición de 7,5 µg/ml de citocalasina B a este medio es opcional) y se incubaron en este medio durante 1 hora a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Los duplicados después se lavaron en TC199 con FCS al 10% y se cultivaron en TC199 con FCS al 10% a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante una noche. Como alternativa, el núcleo donante puede transferirse por inyección manual o con asistencia piezo-eléctrica o por cualquier medio químico o físico para producir fusión celular.

### *Cultivo y evaluación de embriones*

Después del periodo de cultivo durante una noche los duplicados fusionados se impregnaron doblemente en agar al 1% y al 1,2% (DIFCO) (o cualquier otro material de recubrimiento protector adecuado) en PBS y se transfirieron al oviducto ligado de las ovejas sincronizadas. Después de 6 días, las ovejas receptoras se sacrificaron y se recuperaron los embriones mediante lavado abundante del oviducto usando PBS, FCS al 10%. Los embriones se cortan de los chips de agar usando 2 agujas y se evalúa el desarrollo por microscopia. Todos los embriones que se desarrollaron hasta la fase de mórula/blastocisto se transfirieron lo antes posible al cuerno uterino de las ovejas receptoras finales sincronizadas.

### *Transferencia nuclear: nacimientos a partir de ovejas con modificación dirigida por COLT-1*

Los resultados de transferencia nuclear usando dos clones dirigidos por COLT-1, llamados PDCOL6, y 13 se resumen en la Tabla 3.

TABLA 3

### *Transferencia nuclear usando clones celulares dirigidos por COLT-1*

|                                                                     | PDCOL6 | PDCOL13 |
|---------------------------------------------------------------------|--------|---------|
| Nº de embriones reconstruidos                                       | 109    | 154     |
| Nº de embriones recuperados del receptor temporal                   | 104    | 149     |
| Nº de embriones desarrollados hasta mórula o blastocisto            | 14     | 43      |
| Nº de embriones transferidos a receptores finales                   | 14     | 43      |
| Nº de receptores                                                    | 8      | 22      |
| Nº de fetos detectados en el día 60 por exploración de ultrasonidos | 5*     | 10*     |
| Nº de corderos nacidos vivos                                        | 4      | 8       |
| Nº de corderos que sobreviven más de 1 mes                          | 2      | 2       |
| * una preñez doble                                                  |        |         |



Se muestra el análisis tipo Southern de un cordero nacido muerto y uno vivo derivados del clon celular PDCOL6 en la Figura 6. La sonda de hibridación usada era un fragmento COLIA1 de 3 kb que constituye la región 5' de homología presente en los vectores COLT-1 y 2 que revela una banda de 4,73 de diagnóstico del alelo con modificación dirigida y una banda de 7 kb del alelo no modificado. La parte superior de la Figura 7 muestra la estructura del locus dirigido por COLT-1 que muestra la posición de la sonda de hibridación usada para análisis tipo Southern y el origen de los fragmentos observados en la Figura 6.

Estos datos indican que cada cordero analizado mostraba la presencia tanto de alelos de tipo silvestre como de alelos con modificación dirigida.

### Ejemplo 3

#### *Colocación de un transgén en el locus COLIA1 en células fibroblásticas fetales ovinas primarias por modificación génica dirigida*

La construcción COLT-2 se muestra en la Figura 5. COLT-2 se generó por inserción de un fragmento MluI que contenía el casete de expresión de transgén AATC2 en un sitio EcoRV único situado en el extremo 3' del segmento IRES neo de COLT-1.

AATC2 consta de la parte 5' del vector pACTMAD6 (descrito en la solicitud de patente WO 99/03981), que comprende el promotor de la  $\beta$ -lactoglobulina ovina y el primer intrón de la actina cardiaca de ratón, unido al ADNc de la antitripsina  $\alpha$ -1 humana y la parte 3' del vector pMAD (descrito en la solicitud de patente WO 99/03981), que comprende el exón 7 de la  $\beta$ -lactoglobulina ovina, el sitio de poliadenilación y la región flanqueante 3.

El ADN de COLT-2 linealizado con la enzima de restricción SacII se introdujo por transfección en células PDFF2 de pase temprano y se aislaron los clones celulares resistentes a G418 del modo descrito para la introducción por transfección de COLT-1 en el Ejemplo 1.

El transcurso del tiempo del experimento se muestra a continuación:

- |            |                                                                                                                              |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Día 0:     | 30 $\mu$ g de ADN de COLT-2 se introducen por transfección en células PDFF2 en el pase 2 en matraces, 5 X 25 cm <sup>2</sup> |
| Día 2:     | las células transfectadas se siembran en placas petri de 80 X 10 cm de diámetro y se aplican 0,8 mg/ml de G418 de selección  |
| Día 11-12: | se recogen 384 colonias resistentes a G418 vigorosas a pocillos individuales de placas de 6 pocillos.                        |
| Día 15:    | se muestrean 104 clones para análisis por PCR                                                                                |
| Día 15:    | se pasan 15 clones PCR +ivos vigorosos a matraces de 25 cm <sup>2</sup>                                                      |
| Día 18:    | se crioconservan 15 clones                                                                                                   |

Setenta de las 104 muestras celulares se exploraron por PCR usando el mismo procedimiento que para COLT-1. Esto produjo 46 señales positivas, lo que indica una eficacia de modificación dirigida del 66%. Los clones celulares derivados de modificación dirigida con COLT-2 se llamaron PDCAAT.

En la Figura 8 se muestra el análisis tipo Southern de un grupo de clones celulares PDCAAT PCR positivos y un clon PCR negativo. La autorradiografía muestra los resultados de hibridación con un fragmento COLIA1 de 3 kb que constituye la región 5' de homología presente en los vectores COLT-1 y 2. En la Figura 7 se muestra un diagrama de la estructura del locus dirigido por COLT-2 que muestra la posición de la sonda de hibridación y el origen de los fragmentos.

La sonda COLIA1 hibridó con una banda de diagnóstico de 4,73 del alelo con modificación dirigida y una banda de 7 kb del alelo COLIA1 no modificado. Puede observarse que los clones celulares PDCAAT 22, 71, 73, 81, 84, 89, 90, 92 y 95 muestran la presencia de ambos fragmentos en una proporción equimolar, coherente con la modificación dirigida de un alelo COLIA1. El clon 86 muestra solamente el alelo no modificado, coherente con el de PCR negativa. Los clones 87 y 99 muestran la presencia de los alelos con modificación dirigida y no modificado y bandas adicionales que podrían representar los reordenamientos en el locus diana, o acontecimientos de integración aleatoria. No se sabe si éstas indican la presencia de acontecimientos tanto aleatorios como dirigidos dentro del mismo clon celular, o que estos cultivos son oligoclonales. El clon 78 muestra la presencia del fragmento con modificación dirigida a una intensidad inferior que el fragmento no modificado de nuevo quizá indicando que éste no es un clon puro. El ADN de los clones 59 y 125 estaba íntegro.

*Análisis tipo Northern de clones celulares dirigidos por COLT-2*

Los clones celulares PDCAAT 81 y PDCAAT 90 se cultivaron hasta confluencia en matraces de 75 cm<sup>2</sup>, se extrajo el ARN total y se realizó el análisis tipo Northern por procedimientos convencionales.

Muestras duplicadas de 10 µg de cada ARN se sometieron a electroforesis en gel usando un gel de formaldehído agarosa y tampón de procedimiento MOPS. Después de la transferencia, la membrana se cortó a la mitad para proporcionar dos filtros para el análisis tipo Northern. Una mitad se hibridó con un ADNc de COLIA1 humano de 4,1 kb seguido de hibridación con ADNc de β-actina de ratón. El otro medio filtro se hibridó con una sonda de neomicina fosfotransferasa y después con ADNc de β-actina de ratón. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Se predijo que la transcripción del locus dirigido COLIA1 por COLT-2 producía un mensaje bicistrónico, con la parte IRES-neo fusionada al transcrito de COLIA1 después del codón de parada. Los resultados mostrados en la Figura 9 son coherentes con esto. La autorradiografía superior derecha (hibridación con ADNc de colágeno) muestra una única especie de ARNm de aproximadamente 4,8 kb, estimada por la posición del ARNr 28s, correspondiente al ARNm endógeno de COLIA1. De forma interesante, aunque tanto ratones como seres humanos muestran dos especies de ARNm endógeno de COLIA1 a partir de diferentes sitios poli A, las ovejas muestran una única especie. Está presente una especie más larga en los clones PDCAAT 81 y 90, coherente con el tamaño (~6,8 kb) predicho para el ARNm de fusión COLIA1 IRES-neo. La autorradiografía superior izquierda muestra la hibridación con la sonda neo. La única especie de ARNm detectada en PDCAAT 81 y 90 es el tamaño predicho para el mensaje bicistrónico. No se detectaron especies de ARNm con la sonda neo en células PDFF-2 no dirigidas. La hibridación con ADNc de β-actina de ratón se usó como indicación de la cantidad de ARN cargada en ambos filtros y se muestra en los dos paneles inferiores.

También se realizó análisis tipo Northern para investigar si la inserción del transgén AATC2 en el locus COLIA1 conducía a la expresión de AAT dirigida por BLG en fibroblastos. Se usó la hibridación con una sonda antitripsina α1 humana para detectar la expresión del transgén. No era detectable ARNm de AAT en células PDFF-2, PDCAAT81 o PDCAAT90. Por lo tanto, puede concluirse que la inserción del transgén en el locus COLIA1 no induce expresión filtrante significativa de AAT dirigida por BLG en fibroblastos.

*Ejemplo 4**Generación de una oveja que porta un transgén colocado en el locus COLIA1*

Se realizó el análisis de cariotipo de tres clones celulares PDCAAT obtenidos en el Ejemplo 3 como requisito básico para su competencia como donantes nucleares. En cada caso el número de cromosomas global indicaba que cada clon era euploide. La Tabla 4 muestra el número de cromosomas de los clones celulares PDCAAT81, 90 y 95.

TABLA 4

*Número de cromosomas en clones celulares PDCAAT*

| Clon                                                                  | número de proliferaciones contadas | número de proliferaciones 53/54 <sup>1</sup> |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|
| 81                                                                    | 31                                 | 26                                           |
| 90                                                                    | 35                                 | 34                                           |
| 95                                                                    | 24                                 | 18                                           |
| 1 Número de proliferaciones con un recuento de cromosomas de 53 ó 54. |                                    |                                              |

## ES 2 338 631 T3

Los clones celulares PDCAAT 81 y 90 se usaron para transferencia nuclear usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Los resultados de transferencia nuclear se resumen en la Tabla 5.

TABLA 5

*Transferencia nuclear usando clones celulares dirigidos por COLT-2*

|                                                                     | PDCAAT 81 | PDCAAT 90 |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
| Nº de embriones reconstruidos                                       | 71        | 83        |
| Nº de embriones recuperados del receptor temporal                   | 62        | 78        |
| Nº de embriones desarrollados hasta mórula o blastocisto            | 4         | 19        |
| Nº de embriones transferidos a receptores finales                   | 4         | 19        |
| Nº de receptores                                                    | 2         | 10        |
| Nº de fetos detectados en el día 60 por exploración de ultrasonidos | 2         | 3*        |
| Nº de corderos nacidos vivos                                        | 0         | 2         |
| Nº de corderos que sobreviven más de 1 mes                          | 0         | 1         |
| * una preñez doble                                                  |           |           |

El ADN genómico se preparó a partir de biopsias tisulares de corderos obtenidos por transferencia nuclear. En Figura 6 se muestra el análisis tipo Southern de un cordero nacido muerto y uno vivo derivados del clon celular PDCAAT90. Los fragmentos de diagnóstico observados (véase la Figura 7) confirman la presencia del alelo de tipo silvestre y con modificación dirigida en cada caso.

### Ejemplo 5

*Modificación dirigida de un locus génico en células elegidas para proporcionar expresión abundante en el locus diana*

El gen de la lactoglobulina beta (BLG) ovina se expresa específicamente en la glándula mamaria ovina en la gestación tardía y durante la lactación. La modificación génica dirigida en este locus se consiguió eligiendo un tipo celular hospedador apropiado. Éste son células epiteliales mamarias primarias que expresan BLG a elevado nivel en cultivo.

### *Preparación de células epiteliales mamarias ovinas primarias (POME)*

Todos los procedimientos se realizaron en condiciones estériles

1. Se escindió tejido mamario de una oveja preñada de 115 días y se cortó en trozos de 5 cm retirando la grasa y los vasos sanguíneos principales.

2. Los trozos de tejido mamario se lavaron 3 veces con Medio de Disección fresco en una campana de flujo laminar y se cortaron en trozos de 1 cm.

3. A los trozos de tejido se les inyectó Medio de Disociación hasta que el tejido quedó distendido.

4. El tejido se picó en una pasta y se transfirió a un matraz cónico y se añadieron 4 ml de Medio de Disociación por g de tejido.

5. El tejido se incubó en un agitador rotatorio (~200 rpm) a 37 grados C durante 1-5 h hasta que el tejido pasó fácilmente a través de una pipeta Pasteur de orificio ancho.

6. Se usó una serie de etapas de centrifugación diferencial para enriquecer el componente epitelial del tejido mamario.

a. Se centrifugó la suspensión celular a 100 rpm, 30 s

b. Se aspiró y desechó la grasa flotante

## ES 2 338 631 T3

c. Se volvió a digerir el sedimento durante 30-60 min. adicionales y se repitió la etapa a.

d. Se centrifugó el sobrenadante a 800 rpm, 3 min.

e. Se aspiró y desechó la grasa flotante

f. Se resuspendió el sedimento en Medio de Proliferación

g. Se centrifugó el sobrenadante a 1500 rpm, 10 min.

h. Se desechó el sobrenadante

i. Se resuspendió el sedimento en Medio de Proliferación

7. Se combinaron los sedimentos de las etapas 6f e i y las células se sembraron a  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en matraces de cultivo tisular recubiertos con colágeno (Sigma C8919) o fibronectina (Sigma 4759) en Medio de Proliferación que contenía 50 µg/ml de gentamicina (Sigma G1397).

8. Se realizó la inducción de la expresión del gen de la leche en células POME por cultivo de monocapas confluentes durante 3 días en Medio de Inducción

### *Medios usados en la preparación y cultivo de células POME*

#### Medio de Disección

M199 (Gibco/BRL 22340-020) 500 ml

100x antibiótico/antimicótico (Gibco/BRL 15240-039) 10 ml

50 mg/ml de gentamicina (Sigma G1397) 0,5 ml

#### Medio de Disociación

M199 (Gibco/BRL 22340-020) 500 ml

NaHCO<sub>3</sub> (Sigma S5761) 0,6 g

Trypsina (Gibco/BRL170702-018) 0,75 g

Colagenasa A (Boehringer 1088-793) 1,5 g

Suero bovino fetal 25 ml

#### Medio de Proliferación

(1:1) DMEM/F12 (Gibco/BRL 4196-039, 21765-029) 500 ml

Suero bovino fetal 50 ml

5 mg/ml de insulina bovina (Gibco/BRL 13007-018) 0,5 ml

10 g/ml de factor de crecimiento epidérmico (Sigma E4127) 0,5 ml

5 mg/ml de ácido linoleico (Sigma L8384) 0,5 ml

#### Medio de Inducción

(1:1) DMEM/F12 (Gibco/BRL 4196-039, 21765-029) 500 ml

Suero bovino fetal 50 ml

5 mg/ml de insulina bovina (Gibco/BRL 13007-018) 0,5 ml

5 mg/ml de ácido linoleico (Sigma L8384) 0,5 ml

5 mg/ml de prolactina ovina (Sigma L6520) 0,5 ml

Dexametasona 1 mM (Sigma D4902) 0,5 ml

*Expresión e inducción de BLG en células POME cultivadas*

Se analizó la expresión de BLG en células POME cultivadas durante un total de 4 y 9 días en cultivo. Los cultivos de células POME se cultivaron en placas recubiertas con fibronectina (FN) o colágeno tipo I. Las células se cultivaron de forma continua en Medio de Proliferación o se sometieron a inducción de la expresión del gen de la leche por cultivo durante tres días en Medio de Inducción. Se extrajo el ARN total y se sometió a análisis tipo Northern usando procedimientos convencionales.

La Figura 10 muestra el análisis tipo Northern de cultivos de células POME. El filtro mostrado se hibridó con una sonda de BLG ovina. Puede observarse que todos los cultivos expresan cantidades abundantes de ARNm de BLG en el día 4 con una ligera reducción después de 9 días en cultivo. El análisis de células POME en fases posteriores mostró reducciones adicionales en la expresión de BLG. Esto pone de relieve la necesidad de realizar modificación génica dirigida en células POME en un corto periodo después de la obtención. Las células POME que se habían criopreservado directamente después de su obtención se comportaron de una manera similar y podían usarse convenientemente.

El ARNm detectado en este análisis tipo Northern representa la actividad transcripcional del gen de la BLG en cultivo y ningún ARNm residual de la glándula mamaria a causa de la inducción aumentó significativamente la cantidad de mensaje de BLG presente en cada caso.

*Generación de un vector de captura de promotor de BLG BLAT-3*

BLAT-3 es un vector de modificación génica dirigida de captura de promotor diseñado para alterar la expresión del gen de la BLG ovina por inserción de un casete IRES neo en el exón 3.

BLAT3 consta de:

Una región de 1,84 kb en el extremo 5' del gen de la BLG ovina desde un sitio SacI 25 bases 5' del inicio de la traducción hasta un sitio ClaI dentro del exón 3.

Una región de sitio de entrada interno de ribosomas (IRES) de 0,6 kb correspondiente a las bases 1247 a 1856 del vector IRES hygro (Clontech, Número de acceso a Genbank: U89672) Una región de 1,7 pb que contiene el gen neo (que codifica la neomicina fosfotransferasa) y una parte del extremo 3' del gen de la hormona del crecimiento humana que contiene el sitio de poliadenilación, esencialmente igual que el descrito por McWhir y *col.*, (Nature Genetics 14, 223-226, 1996).

Una región de aproximadamente 12 kb del gen de la lactoglobulina beta ovina desde un sitio ClaI dentro del exón 3 hasta un punto aproximadamente 9 kb 3' del sitio de poliadenilación correspondiente al extremo de un clon genómico en el fago lambda.

La estructura del vector BLAT-3 y la posición de los cebadores de PCR usados para detectar los acontecimientos de modificación dirigida se muestran en la Figura 11.

*Modificación dirigida de BLG en células POME usando el vector BLAT-3*

El ADN de BLAT-3 linealizado con SalI se introdujo por transfección en células POME de pase temprano y se obtuvieron clones resistentes a G418 como se describe a continuación:

Día 0 Se introducen por transfección 6 µg de ADN usando lipofectAMINA en matraz 1 X 25 cm<sup>2</sup> (pre-recubierto con colágeno) de células POME

Día 1 Las células transfectadas se siembran en placas petri 6 X 10 cm de diámetro y se aplican 0,8 mg/ml de G418 de selección

Día 14-17 Las colonias resistentes a G418 se recogen en placas de 6 pocillos recubiertas con colágeno

Día 21-25 Se toman muestras para el análisis por PCR, los clones se criopreservan.

El esquema de PCR usado para identificar las células POME que habían experimentado un acontecimiento de modificación génica dirigida se basó en el uso de un cebador que hibridaba con una región dentro de la región IRES de BLAT3 (cebador COLTPCR8) y uno que hibridaba con una región del promotor de BLG no contenido dentro del vector (cebador BLAT3-3). La posición aproximada de estos cebadores se muestra en la Figura 11 y la secuencia de cada cebador era la siguiente:

BLAT3-3: TAAGAGGCTGACCCCGGAAGTGTT  
COLTPCR8: GACCTTGCATTCCTTTGGCGAGAG

## ES 2 338 631 T3

Las muestras de células a explorar se lisaron en tampón de lisis de PCR (KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris 10 mM pH 8,5, NP40 al 0,5%, Tween al 0,5%) más Proteinasa K, y se incubaron a 65°C durante 30 min. La Proteinasa K se inactivó a 95°C durante 10 min. y la reacción en cadena de la polimerasa se realizó usando el sistema de PCR con cebadores largos de gran expansión ("Expand long template PCR system") (Boehringer) siguiendo las condiciones

recomendadas por los fabricantes. Las condiciones de ciclado térmico son las siguientes:

|    |              |                    |
|----|--------------|--------------------|
|    | 94°C         | 2 min.             |
| 10 | 10 ciclos de |                    |
|    | 94°C         | 10 s               |
|    | 60°C         | 30 s               |
| 15 | 68°C         | 2 min.             |
|    | 20 ciclos de |                    |
|    | 94°C         | 10 s               |
| 20 | 60°C         | 30 s               |
|    | 68°C         | 2 min.+ 20 s/ciclo |
|    | 68°C         | 5 min.             |

La Figura 12 muestra el electroferograma en gel de agarosa de productos de PCR amplificados a partir de 16 clones de células POME transfectadas con BLAT-3 resistentes a G418. Uno de estos (clon 3) muestra la presencia del fragmento de diagnóstico de 2,375 kb indicativo de integración del gen IRES neo en el locus BLG por recombinación homóloga.

### Ejemplo 6

#### *Eliminación del locus del gen de la alfa 1,3 galactosiltransferasa en fibroblastos fetales porcinos primarios por re-combinación homóloga*

Un obstáculo principal en el xenotransplante es la existencia de rechazo hiperagudo (HAR) que destruye las células endoteliales vasculares en el órgano donante por un mecanismo dependiente del complemento. Se ha identificado un antígeno de carbohidrato, Gal  $\alpha 1 \rightarrow 3$ Gal, como el antígeno principal responsable del HAR (Sandrin y col., Transplant Rev 8, 134-139, 1994). Aunque la mayoría de los mamíferos tienen la estructura Gal  $\alpha 1 \rightarrow 3$ Gal, está carente en los seres humanos, y los sueros humanos tienen anticuerpos potentes contra el epítipo antigénico (Galili y col., J Exp Med 160, 1519-1531, 1984). La estructura antigénica de carbohidrato se forma a través de la acción de una enzima, la  $\alpha$  1,3-galactosiltransferasa, que transfiere la galactosa desde UDP-galactosa hasta N-acetilactosamina (Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc), produciendo Gal $\alpha 1 \rightarrow 3$ Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc. Se han generado ratones knockout para la alfa 1,3-galactosiltransferasa y las células de estos ratones son menos susceptibles a ataque citotóxico por sueros humanos (Tearle y col., Transplantation, 61, 13-19, 1996). Estos resultados indican que la eliminación de la actividad  $\alpha$  1,3-galactosiltransferasa en células u órganos porcinos debe reducir drásticamente el HAR cuando se usan estos tejidos para xenotransplante. El ADNc de la  $\alpha$  1,3-galactosiltransferasa porcina se ha clonado y el análisis de transfección confirmó que estos clones codificaban  $\alpha$  1,3-galactosiltransferasa funcional (Sandrin y col., Xenotransplantation 1, 81-88, 1994). Recientemente, se ha clonado el ADNc de longitud completa de la  $\alpha$  1,3-galactosiltransferasa (GT) porcina (3,2 Kb) y se ha informado de su organización genómica (6 exones que abarca una región de 24 kb) (Katayama, A y col., Glycoconjugate J, 15, 583-589, 1998). El objetivo fue eliminar el gen de la  $\alpha$  1,3 GT en células porcinas primarias por recombinación homóloga, y el uso de las células knockout como donantes nucleares para transferencia nuclear en célula somática para producir cerdos GT-deficientes.

### Aislamiento de fibroblastos fetales PFF4 Porcinos Primarios

Se preparó un feto porcino (cruce Large White x Yorkshire) a 33 días de gestación para aislamiento celular eliminando primero la cabeza y las entrañas, lavando tres veces con DMEM, y después picando el tejido fetal restante en aproximadamente 20 ml de DMEM con tijeras estériles. El tejido finamente picado después se transfirió a un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml, y se centrifugó para retirar el DMEM. Después el tejido se digirió con colagenasa (100 u/ml en 40 ml), durante 1 h. a 37°C en un baño de agua en agitación. Los agregados de tejido desmenuzaron con pipeteado vigoroso, y la suspensión celular resultante se agitó para retirar la solución de colagenasa. La suspensión celular digerida después se sembró en tres matraces T-75 en DMEM + FBS al 10% + aminoácidos no esenciales y esenciales. Las células fueron confluyente en dos días, y se pasaron en seis matraces T-75. Después de dos días, los matraces se recolectaron, y se congelaron las células en 100 crioviales de 1 ml.

## ES 2 338 631 T3

### *Construcción del vector knockout de $\alpha$ -1,3 GT porcina (pPL501)*

Las células del cultivo de fibroblastos fetales primarios, PFF4, se usaron para el aislamiento de ADN genómico. El ADN genómico de células PFF4 se usó para clonar por PCR secuencias de ADN isogénicas de  $\alpha$ -1,3 GT para su uso en la construcción de un vector knockout de  $\alpha$ -1,3 GT porcina. El vector knockout se diseñó como un vector de tipo reemplazo, incorporando más de 10 kb de homología, para maximizar la frecuencia de recombinación. Como el gen de la  $\alpha$ -1,3 GT se expresa en células fibroblásticas, se utilizó una estrategia de captura de promotor para enriquecer los acontecimientos de recombinación homóloga.

El vector knockout de captura de promotor de  $\alpha$ 1,3 GT porcina, pPL501, se construyó a partir de los siguientes tres componentes (Figura 13):

(1) El brazo de recombinación 5' consta de una secuencia genómica generada por PCR de 9 kb, del gen de la  $\alpha$ 1,3 GT, de células fibroblásticas fetales primarias porcinas (PFF4); que consta de 64 pares de bases desde el extremo 3' del exón 4, que se extiende desde el intrón 4 hasta el intrón 6, y que incluye 81 pares de bases desde el extremo 5' del exón 7. Los cebadores de PCR usados para clonar esta región de 9 kb fueron los siguientes:

GAGTGGTTCTGTCAATGCTGCT (5')

GGAAGCTCTCCTCTGTTGTCTT (3')

(2) Un marcador neo de selección sin promotor que consta de un fragmento BamHI-XhoI de 2.057 kb, que contiene el casete de expresión IVS-IRES-neo-BGHpA (de pIRESneo; Clontech; N° de acceso a GenBank U89673).

(3) un brazo de recombinación 3' que consta de una secuencia de  $\alpha$ 1,3 GT generada por PCR de 1,8 kb desde el exón 9 (que empieza 84 pb desde el extremo 5' del exón 9, y que se extiende 1844 pb hasta el extremo 3' del exón 9), también de células PFF4. Los cebadores de PCR usados para clonar esta secuencia de 1,8 kb fueron los siguientes:

GGTGGATGATATCTCCAGGATGCCT (5')

GCTGTTTAGTCATGAGGACTGGGT (3')

La integración aleatoria de la construcción de captura de promotor no confiere resistencia a G418. La recombinación homóloga provoca la inserción del gen neo sin promotor, en el exón 7, cadena abajo del promotor endógeno de la  $\alpha$ -1,3 GT, lo que permite la transcripción de un mensaje bicistrónico. La traducción de la región codificante de neo, desde el locus dirigido, se inicia en el sitio de entrada interno de ribosomas. La recombinación homóloga provoca, no solamente la inserción del casete IRES-neo en el exón 7, sino la delección del exón 8, interrumpiendo de este modo la región codificante de  $\alpha$ -1,3 GT, y creando un alelo nulo. Durante la construcción del vector pPL501, la secuenciación de la unión 5' de la región de homología de 9 kb reveló un polimorfismo de secuencia. No se sabe si éste era un polimorfismo natural entre los dos alelos de  $\alpha$ -1,3 GT de PFF4, o un error de PCR, por lo tanto, se creó un segundo vector knockout, pPL502 que es idéntico a pPL501, excepto en el uso del brazo de recombinación 5' de 9 kb polimórfico. Se usaron tanto pPL501 como pPL502, en cantidades equimolares, para las transfecciones.

### *Transfección de células PFF4 Primarias con el vector de modificación dirigida de alfa-1,3 GT*

Se introdujeron por transfección cantidades equimolares de los vectores knockout pPL501/502 en forma circular superenrollada y covalentemente cerrada en células PFF4 de pase temprano y se aislaron los clones resistentes a G418 como se resume a continuación:

Día 0: Se sembraron células PFF4 en pase 3 en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> al 40% de confluencia.

Día 1: Después de 24 horas, las células PFF4 estaban al 80% de confluencia, y se transfectaron con 8  $\mu$ g de ADN de pPL501/502 usando 40  $\mu$ l del reactivo GenePORTER siguiendo el procedimiento recomendado por los fabricantes (Gene Therapy Systems).

Día 2: Las células transfectadas se dividieron en ocho placas de 48 pocillos y ocho placas de 24 pocillos en medio que contenía 350  $\mu$ g/ml de G418

Día 16: Se aislaron 94 colonias G418<sup>R</sup> y se volvieron a sembrar en placas de 12 pocillos. Se muestrearon 45 de las colonias de mejor crecimiento para el análisis por PCR.

Día 20-25: Las colonias se expandieron en matraces de 25 cm<sup>2</sup>.

Día 25-31: Las colonias expandidas se crioconservaron.

## ES 2 338 631 T3

De principio a fin, las células PFF4 se cultivaron en DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales (1X), factor de crecimiento de fibroblastos básico (2 ng/ml), suero bovino fetal al 10% en matraces y placas de cultivo tisular convencionales, en una cámara de cultivo tisular humidificada usando una atmósfera compuesta de O<sub>2</sub> al 5%, CO<sub>2</sub> al 5%, y N<sub>2</sub> al 90%. Las células se pasaron por tratamiento con tripsina convencional.

El análisis por PCR se realizó para explorar los recombinantes potenciales, usando cebadores diseñados para distinguir entre integrantes aleatorios y recombinantes homólogos.

La secuencia de estos cebadores se muestra a continuación.

Neo442s: CATCGCCTTCTATCGCCTTCTT (5')

Alfa-Gte9a2: AGCCCATCGTGCTGAACATCAAGTC (3')

El cebador Neo442s se diseñó para unirse con secuencias en el extremo 3' del gen neo; mientras que el cebador alfa-gte9a2 se une a secuencias en el exón 9 de la GT fuera de la región incluida en el vector de modificación dirigida. Las posiciones de estos cebadores con relación a la estructura predicha del locus dirigido se muestran en la Figura 14.

Las células se recogieron de las 45 colonias G418<sup>R</sup> para la exploración por PCR, y se lisaron en tampón de lisis de PCR (Tris-HCl 40 mM pH 8,9, Triton X-100 al 0,9%, Nonidet P40 al 0,9%, 400 µg/ml de proteinasa K) a 50°C durante 15 minutos. Se incubaron 5 µl de células lisadas (-2-5000 células) a 65°C durante 15 minutos, seguido de inactivación de la Proteinasa K a 95°C durante 10 min. La amplificación por PCR se realizó usando la Taq polimerasa de elevada fidelidad de expansión ("Expand High Fidelity") (Roche Molecular Biochemicals) siguiendo las condiciones recomendadas por los fabricantes. Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes:

|                      |      |                                                            |
|----------------------|------|------------------------------------------------------------|
|                      | 94°C | 2 min.                                                     |
| 30 ciclos de         |      |                                                            |
|                      | 94°C | 15 s                                                       |
|                      | 64°C | 30 s                                                       |
|                      | 68°C | 4 min. (con incrementos de tiempo de 20 s/ciclo crecientes |
| en los ciclos 10-30) |      |                                                            |
|                      | 72°C | 7 min.                                                     |

La amplificación de un producto de 2,4 kb (cuyo extremo 3' se origina en el gen endógeno) indicó que la integración de la construcción se debía a recombinación homóloga en el sitio correcto dentro del locus alfa 1,3 GT. Quince de las 45 colonias G418<sup>R</sup> (33%) mostraron la presencia del fragmento de PCR de 2,4 kb, diagnóstico de un acontecimiento de recombinación dirigido. Los productos de PCR de cuatro colonias independientes se subclonaron en el vector pCR-XL-TOPO y se secuenciaron para verificar la recombinación. Los resultados ilustrados en la Figura 15 demuestran que las secuencias desde el extremo 3' de cada uno de los productos de PCR secuencias correspondían a la secuencia esperada de recombinación homóloga correcta.

Estas células knockout de  $\alpha$ -1,3 GT ahora servirán como donantes nucleares para la transferencia nuclear en célula somática para la producción de cerdos deficientes en la enzima alfa 1,3 galactosiltransferasa.

### Ejemplo 7

*Eliminación del locus del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) bovina en fibroblastos fetales bovinos primarios (HFF5) por recombinación homóloga*

La  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) bovina es uno de los alérgenos principales implicados en respuestas alérgicas humanas a las proteínas de la leche de vaca. La eliminación del gen BLG en células de vaca, en combinación con transferencia nuclear en célula somática, para producir una baja BLG-deficiente, y posteriormente leche libre de BLG, presenta la oportunidad de crear una leche maternizada para bebés menos alérgica y más parecida a la humana.

Se ha clonado el ADN genómico y el ADNc de BLG bovina (Hyttinen y col., J Biotechnol, 61, 191-198, 1998; Alexander y col., Nucleic Acids Res, 17, 6739, 1989). Usando la información de secuencia de GenBank (Nº de acceso a GenBank Z48305), se volvieron a clonar partes del gen de BLG a partir de células fibroblásticas fetales bovinas primarias, para su uso en la construcción del vector knockout de BLG. Como el gen de BLG no se expresa en fibroblastos fetales primarios, el vector knockout de BLG se diseñó para incorporar una estrategia de captura de poliA para enriquecer los acontecimientos de recombinación homóloga.



## ES 2 338 631 T3

### *Aislamiento de fibroblastos fetales HFF5 bovinos primarios*

Se recogió un feto macho Holstein élite a aproximadamente 55 días de gestación de un matadero local y se preparó para el aislamiento. Del feto se eliminó primero las membranas placentarias y después se lavó tres veces con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) a temperatura ambiente. En una alícuota de 20 ml fresca de DMEM, se separó la piel superficial y el tejido subdérmico de la estructura esquelética usando pequeñas tijeras y después se trocó lo más finamente posible. El tejido picado después se centrifugó y el DMEM se reemplazó con 50 ml de colagenasa a 100 unidades por ml de DMEM. El tejido se digirió durante 1 h en un baño de agua a 37°C. El tejido picado después se desmenuzó con pipeteo repetido y la suspensión celular resultante se centrifugó para retirar la solución de colagenasa. El sedimento celular después se resuspendió en DMEM completo más suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales (1X) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (2 ng/ml) más gentamicina. Las células se sembraron en 4 matraces T-75. Las células resultantes eran confluentes y se congelaron tres días después del aislamiento.

### 15 *Construcción de Vector Knockout de Captura de Poli A*

El vector knockout de captura de poliA de BLG bovina pPL522 se construyó a partir de los siguientes tres componentes (véase la Figura 16):

20 (1) El brazo de recombinación 5' consta de una secuencia genómica generada por PCR de 10 kb que comprende la región promotora de BLG a hasta 89 pb cadena abajo desde el primer ATG en el exón 1, derivado del ADN aislado de los fibroblastos fetal Holstein (HFF5) primarios. Los cebadores usados para generar el fragmento de PCR fueron:

25 BoBLGpro: 5' CCA GTG CTG ATT TGA TTT CCT ACT CAC GCC 3'

BoBLGpro7: 5' ACC TTC TGG ATA TCC AGG CCC TTC ATG GTC 3'

30 (2) Un marcador de selección sin poli A que comprende un fragmento XhoI-SmaI de 1415 pb que contiene el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK) de ratón, y un casete del gen neo sin una señal poli A, del pPL442 que se obtuvo de pKOTKneoV904 (Lexicon Genetics Inc., Woodlands, Texas);

35 (3) El brazo de recombinación 3' es un fragmento NcoI-BamHI de 1935 pb generado por PCR de la secuencia genómica de BLG (Nº de acceso a GenBank Z48305) de células HFF5. Este brazo 3' contiene secuencias de BLG que comprenden 114 pb desde el extremo 3' del exón 2, el intrón 2, el exón 3 y 885 pb desde el extremo 5' del intrón 3.

### *Transfección de células HFF5 Primarias con el vector knockout de BLG*

40 Las células HFF5 se mantuvieron a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%, en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales (1X), y factor de crecimiento de fibroblastos básico (2 ng/ml). El medio de selección contenía 350 µg/ml (concentración activa, Gibco-BRL) de G418.

Se transfirió el ADN del vector knockout de BLG pPL522 sin lialización por digestión de restricción (forma circular superenrollada y cerrada) en células HFF5 por lipofección, usando GenePORTER (Gene Therapy Systems), y las colonias resistentes a G418 se seleccionaron del siguiente modo:

- 50
- Día 0: Se descongelaron células HFF5 en el pase 1 (1 millón de células por vial) a partir del nitrógeno líquido y se sembraron en un matraz de 25 cm<sup>2</sup>
- Día 1: Las células a confluencia de aproximadamente el 60% se transfectaron con 2 ml de medio de transfección que contenía 1 µg de ADN no digerido de pPL522 (>70% superenrollado) y 20 µl de reactivo GenePORTER. Las células se incubaron en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Después de 4 horas, se añadieron 2 ml de medio de crecimiento (DMEM + FCS al 20%).
- 55
- Día 2-12: Las células transfectadas se trataron con tripsina a las 24 horas después de la transfección y se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 2500 a 5000 células por pocillo en medio de selección con 350 µg/ml de G418. Las células se incubaron en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. El medio se cambió cada 3 días durante la selección.
- 60
- Día 13-15: Se pasaron ochenta y cinco colonias desde las placas de 24 pocillos a placas de 12 pocillos. Los pocillos que contenían más de una colonia distinguible se recogieron como combinaciones (8 a 12 colonias por combinación). Un total de 21 combinaciones se sometió a análisis por PCR.
- 65
- Día 15-17: Cincuenta y dos colonias únicas bien aisladas de las placas de 12 pocillos, después de alcanzar la confluencia, se pasaron a placas de 60 mm. Una alícuota de cada colonia se sometió a análisis por PCR.

## ES 2 338 631 T3

Día 17-22: Las células restantes de cada una de las 52 colonias únicas se congelaron (2 viales para cada colonia), y se almacenaron a -70°C.

### 5 Exploración por PCR de colonias resistentes a G418

Las colonias y combinaciones resistentes a G418 se exploraron por análisis de PCR, usando cebadores diseñados para distinguir entre acontecimientos de integración aleatoria y recombinación homóloga (Figura 17). El cebador 5' (Neo442s) se une al extremo 3' del gen neo dentro del vector knockout. El cebador 3' (BLG3'1) se une a una región del exón 4 de la BLG bovina que está fuera de las secuencias presentes en el vector knockout (aproximadamente 260 pb 3' del extremo 3' del brazo homólogo 3' de BLG en el vector. Las secuencia cebadoras se muestran a continuación:

Neo442s: 5' CAT CGC CTT CTA TCG CCT TCT T 3'

15 BLG3'1: 5' CCA GCA CAA GGA CTT TGT TCT C 3'

Las células se lisaron en tampón de lisis de PCR (Tris-HCl 40 mM pH 8,9, Triton X-100 al 0,9%, Nonidet P40 al 0,9%, 400 µg/ml de proteinasa K) a 50°C durante 15 minutos. Se incubaron cinco µl de células lisadas (5000-10000 células) a 65°C durante 15 minutos, seguido de inactivación de la proteinasa K a 95°C durante 10 minutos. La amplificación por PCR se realizó usando Taq polimerasa de elevada fidelidad de expansión ("Expand High Fidelity") (Roche Molecular Biochemicals) y el protocolo del fabricante con el siguiente programa de ciclado térmico:

94°C 1 minuto

25 60°C 1 minuto

72°C 2 minutos

35 ciclos

30 La amplificación de un producto de 2,3 kb (cuyo extremo 3' se origina en el gen endógeno, no la construcción) indica que la integración de la construcción se debía a recombinación homóloga dentro del locus BLG.

### 35 Subclonación y secuenciación de productos de PCR

De las 52 colonias únicas y las 21 combinaciones (comprendiendo cada combinación de 8 a 12 colonias), 5 colonias únicas (9,6%) y 17 combinaciones (81%) mostraron productos de PCR positivos. Se subclonaron los productos de PCR de 3 colonias únicas en el vector pCR-XL-TOPO (Invitrogen), y se secuenciaron 2 subclones de cada una de las 3 colonias únicas (6 clones en total), generando más de 400 pb de secuencia desde ambos extremos. Los resultados de secuenciación mostraron que todos los subclones coincidían con la secuencia esperada después de la recombinación homóloga correcta (Figura 18).

### 45 Ejemplo 8

#### *Detección de AAT transgénico en la leche de ovejas con el locus del colágeno modificado de forma dirigida*

50 La leche de lactación inducida de la oveja producida en el Ejemplo 4 se diluyó 1:100 con fosfato Na 50 mM, pH 7,2 y se trataron 10 µl con un volumen igual de tampón de muestra SDS no reductor antes de cargarlos en un gel de SDS Tris/Glicina al 8-16%. También se cargó una cantidad equivalente de leche de una oveja de control (tgAAT negativa). Se cargaron 200 ng de leche de oveja que se sabe que incluyen tgAAT a una concentración conocida como control positivo.

55 Después de la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilo) que se bloqueó con BSA al 2% en PBS durante 1 hora. La mancha de transferencia se sondeó durante 30 min. con un anticuerpo policlonal de conejo anti-AAT humano diluido 1:2000 con BSA al 1%/PBS/Tween-20 al 0,1% (PBS-T). Después de lavar 5 veces durante 30 min. con PBS, se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano rusticano durante 30 min. a una dilución de 1:5000 en BSA al 1%/PBS-T. Después de un lavado final con PBS como anteriormente, la mancha de transferencia se reveló usando sustrato DAB (diamino benzidina) (Figura 19).

65

## ES 2 338 631 T3

| Carril | Muestra                      | Masa/volumen |
|--------|------------------------------|--------------|
| 1      | Véanse los marcadores azules | 10 $\mu$ l   |
| 2      | 31 ene. a.m.                 | 0,1 $\mu$ l  |
| 3      | 31 ene. p.m.                 | 0,1 $\mu$ l  |
| 4      | 01 feb. a.m.                 | 0,1 $\mu$ l  |
| 5      | 01 feb. p.m.                 | 0,1 $\mu$ l  |
| 6      | 02 feb. a.m.                 | 0,1 $\mu$ l  |
| 7      | 02 feb. p.m.                 | 0,1 $\mu$ l  |
| 8      | 03 feb. a.m.                 | 0,1 $\mu$ l  |
| 9      | Leche de Control (negativa)  | 0,1 $\mu$ l  |
| 10     | TgAAT (positivo)             | 200 ng       |

La mancha de transferencia revelada se exploró y se realizó densitometría para evaluar el nivel de expresión de tgAAT. Las áreas de pico de las bandas de tgAAT se usaron para calcular la cantidad presente en cada carril con referencia al material patrón positivo conocido. Finalmente, estos valores se corrigieron a la dilución inicial para dar el nivel de expresión en leche completa (siguiente Tabla 6). El cambio en el nivel de expresión a lo largo de la recogida de leche se muestra gráficamente en la Figura 20.

La banda de peso molecular más elevado observada en las muestras de leche de oveja con modificación dirigida corresponde a la masa de IgG y es probable que sea el caso si los niveles de IgG son particularmente elevados en estas muestras de recogida de leche tempranas (tipo calostro). Su aspecto en la mancha de transferencia puede deberse a una ligera reactividad cruzada entre especies con el anticuerpo secundario anti-IgG.

TABLA 6

*Niveles de expresión de tgAAT en muestras de leche evaluadas por densitometría con referencia a una muestra de control positivo conocida*

| Recogida de leche | Nivel de expresión (leche completa) en $\mu$ g/ml |
|-------------------|---------------------------------------------------|
| 31 ene. a.m.      | 674,5                                             |
| 31 ene. p.m.      | 502,7                                             |
| 1 feb. a.m.       | 298,3                                             |
| 1 feb. p.m.       | 337,6                                             |
| 2 feb. a.m.       | 154,3                                             |
| 2 feb. p.m.       | 120,8                                             |
| 3 feb. a.m.       | 329,7                                             |

La oveja está produciendo tgAAT en su leche. Esta cantidad se asemeja favorablemente con el nivel más elevado previamente presentado para un transgén de ADNc de AAT en una oveja que porta múltiples insertos génicos aleatorios (18  $\mu$ g/ml) como se describe en Mc-Clenaghan M y col., (Animal Biotechnology 2 161-176 1991). De forma interesante y más sorprendentemente, este hallazgo indicaba que el locus COLIA1 puede proporcionar un entorno permisivo para la expresión de transgenes aun cuando el colágeno tipo 1 no se exprese a sí mismo activamente en epitelio mamario; Warburton y col., (J. Cell Physiol. 128 76-84 1986).

En este ejemplo, la inducción hormonal de la lactación en las ovejas inmaduras se realizó esencialmente como se describe por Ebert y col., (Biotechnology 12, 699-702, 1994). A la oveja se le inyectó dos veces diariamente durante siete días benzoato de estradiol (0,05 mg/kg) y progesterona (0,1250 mg/kg) para estimular el desarrollo mamario y la liberación de prolactina. Dieciocho días después de la primera inyección, a la oveja se le inyectó cada mañana durante tres días dexametasona (5 ml/día). Durante toda la inducción, la oveja se alojó bajo luces que imitan la luz del día natural. Veintiún días después de la primera inyección, se inspeccionó la ubre y tuvo lugar la recogida de leche.

Ejemplo 9

*Descripción de la transferencia nuclear doble*

5 I) *Protocolo para la transferencia nuclear porcina*

*Procedimiento de sincronización para la recogida de ovocitos porcinos madurados in vivo*

10 A continuación se describe un procedimiento adecuado para la recogida de ovocitos porcinos madurados *in vivo*. En la práctica, puede usarse cualquier procedimiento que provoque la producción de ovocitos adecuados.

15 Se suministra Altrenogest (Regu-Mate, 18 mg/día, 9 AM) durante 5-9 días, empezando en el día 12-16 del ciclo (el día 0 es el celo). Si no hay celos disponibles, se suministra Altrenogest durante 14 días. Se inyecta a las lechonas Estrumate (IM, 1,0 ml, 9 AM) durante el último suministro de Alternogest. Se inyecta eCG (gonadotropina coriónica equina, 1500 IU IM) 14 horas (11 PM) después del último suministro de Altrenogest. Se inyecta hCG (gonadotropina coriónica humana, 1000 IU, IM) 80 horas después de la inyección de eCG (7 AM). Se recogen los ovocitos 50 horas después de la inyección de hCG (9 AM).

20 *Primera fase de la reconstrucción de embriones por transferencia nuclear*

Está disponible una gama de protocolos para la primera fase de transferencia nuclear. Su uso está dictaminado por la fase del ciclo celular del núcleo de la célula donante en el momento de la transferencia.

25 1. “MAGIC” (del inglés *Metaphase Arrested G1/G0 Accepting Cytoplast (citoplasto aceptor G1/G0 detenido en metafase)*)

30 Los ovocitos enucleados se mantienen en medio libre de calcio con FCS al 10% a 39°C. En la primera fase de transferencia nuclear actualmente se prefiere, aunque no es esencial, que el material genético donante se introduzca en el ovocito enucleado por inyección piezo asistida. Para ayudar a la inyección, los receptores de citoplasto pueden centrifugarse a 13.000xG durante 5 minutos. La célula donante se coloca en medio que contiene Polivinil Pirrolidona al 12% (opcional), la célula se extrae en la pipeta de inyección y después se inyecta en el ovocito, la membrana celular puede dañarse intencionadamente por selección de una pipeta de tamaño apropiado y/o la aplicación de una ráfaga de 35 piezo vibración y el pipeteado repetido. El tamaño de la pipeta de inyección depende del tamaño de la célula. Como alternativa, la transferencia del núcleo puede conseguirse por fusión celular. También pronto como fue posible después de la enucleación, se puso en contacto una única célula con el ovocito usando una pipeta de vidrio para transferir la célula a través del orificio creado previamente en la zona pelúcida. El pareado citoplasto/célula después se transfiere en medio de fusión (D-Sorbitol 0,3 M suplementado con MgSO<sub>4</sub> 0,1 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM en H<sub>2</sub>O, osmolalidad 40 280 mOsM) en la cámara de fusión. El pareado se alineó manualmente entre los electrodos. La fusión se indujo por la aplicación de dos pulsos de CC de 1 kV/cm durante 60  $\mu$ segundos a intervalos de 5 s. Los duplicados después se lavaron en medio libre de calcio suplementado con FCS al 10% a 37°C y se incubaron en el mismo medio en aceite a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Treinta minutos antes de la activación, los duplicados se transfirieron a medio libre de calcio con FCS al 10% que contenía Nocodazol 5  $\mu$ M. La activación se indujo como se describe a continuación, después de la 45 activación se incubaron los cigotos reconstruidos en medio NCSU23, FCS al 10% a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 horas adicionales. Después se lavaron 3 veces durante 5 minutos a 37°C en el mismo medio sin nocodazol y se cultivaron durante un periodo de tiempo adicional suficiente para la formación de un pronúcleo antes de usarlos como donantes nucleares para la segunda fase de reconstrucción de embriones por transferencia nuclear. Como alternativa, el núcleo donante puede transferirse por inyección manual o piezo asistida o por cualquier otro medio químico o físico para 50 producir fusión celular.

2. “GOAT” (del inglés *G0/G1 ACTIVACIÓN AND TRANSFER (activación y transferencia G0/G1)*)

55 Los ovocitos enucleados se devolvieron al medio de maduración. A las 30 o 42 horas después del inicio de la maduración, se puso en contacto una única célula con el ovocito enucleado.

60 El pareado se transfirió a la cámara de fusión (véase a continuación) en medio de fusión D-Sorbitol 0,3 M suplementado con MgSO<sub>4</sub> 0,1 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM en H<sub>2</sub>O, osmolalidad 280 mOsM. La fusión y la activación se indujeron por la aplicación de dos pulsos de CC de 1 kV/cm durante 60  $\mu$ segundos a intervalos de 5 s. Los duplicados después se lavaron en NCSU23 con FCS al 10% y se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante un periodo de tiempo adicional suficiente para la formación de un pronúcleo antes de usarlos como donantes nucleares para la segunda fase de la reconstrucción de embriones por transferencia nuclear. Como alternativa, el núcleo donante puede transferirse por inyección manual o piezo asistida o por cualquier otro medio químico o físico para producir fusión celular. 65

### 3. "RECEPTOR UNIVERSAL"

Los ovocitos enucleados se activaron (como se describe a continuación) y se cultivaron en NCSU23, FCS al 10% a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la disminución de la actividad MPF, se puso en contacto una única célula con el ovocito y se indujo la fusión como se describe a continuación. Los duplicados después se cultivaron en NCSU23 con FCS al 10% a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante un periodo de tiempo adicional suficiente para la formación de un pronúcleo antes de usarlos como donantes nucleares para la segunda fase de la reconstrucción de embriones por transferencia nuclear. Como alternativa, el núcleo donante puede transferirse por inyección manual o piezo asistida o por cualquier otro medio químico o físico para producir fusión celular.

#### *Preparación de un citoplasto para la segunda transferencia nuclear de la reconstrucción de embriones*

Puede prepararse un citoplasto adecuado por activación de un ovocito enucleado como se ha descrito en el 'RECEPTOR UNIVERSAL'. Como alternativa, que se prefiere actualmente, puede prepararse un receptor de citoplasto a partir de cualquier cigoto producido *in vivo* o *in vitro*. Después de la formación pronuclear, puede centrifugarse el cigoto, en un medio tamponado adecuado, a 13.000xg durante 5 minutos, esto ayuda a la visualización de los pronúcleos pero no es esencial. Los cigotos centrifugados se colocan en la cámara de manipulación en un medio adecuado (como anteriormente) y se aspira una parte del citoplasma que contiene los dos pronúcleos usando una micropipeta.

#### *Segunda fase de la reconstrucción de embriones por transferencia nuclear*

Procedimiento de sincronización para la recogida de cigotos porcinos de 1 célula fertilizados *in vivo*.

A continuación se describe un procedimiento adecuado para la recogida de ovocitos porcinos madurados *in vivo*. En la práctica, puede usarse cualquier procedimiento que provoque la producción de ovocitos adecuados.

Se suministra Altrenogest (Regu-Mate, 18 mg/día, 9 AM) durante 5-9 días, empezando en el día 12-16 del ciclo (el día 0 es el celo). Si no hay celos disponibles, se suministra Altrenogest durante 14 días. Se inyecta a las lechonas Estrumate (IM, 1,0 ml, 9 AM) durante el último suministro de Alternogest. Se inyecta eCG (gonadotropina coriónica equina, 1500 IU IM) 14 horas (11 PM) después del último suministro de Altrenogest. Se inyecta hCG (gonadotropina coriónica humana, 1000 IU, IM) 79 horas después de la inyección de eCG (6 AM). Se inseminan artificialmente 24 y 36 horas después de la inyección de hCG. Los embriones se recogen 50 horas después de la inyección de hCG (mediodía).

#### *Reconstrucción del embrión de la segunda fase de transferencia nuclear*

El carioplasto formado por aspiración del pronúcleo rodeado por una parte del citoplasma y la membrana unida del embrión de la primera transferencia nuclear se coloca por debajo de la zona pelúcida del segundo citoplasto receptor en contacto con el citoplasto. La fusión del carioplasto y el citoplasto se realiza del siguiente modo o por cualquier otro medio. Como alternativa, el carioplasto, el pronúcleo o el pronúcleo rodeado por una parte del citoplasma puede inyectarse en el embrión de la segunda transferencia nuclear.

#### *Cultivo de embriones reconstruidos*

Los embriones reconstruidos pueden cultivarse *in vitro* usando cualquier medio y condiciones de cultivo adecuados, por ejemplo, medio NCSU suplementado con FCS al 10% a 37°C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5,0%. Como alternativa, ya que es el procedimiento actualmente de elección en especies porcinas, los embriones reconstruidos pueden transferirse directamente a un receptor final sincronizado para el desarrollo a término. Se ha determinado que la transferencia de embriones a un receptor sincronizado soporta un buen desarrollo embrionario y fetal. En experimentos de control, los cigotos porcinos se manipularon de forma simulada para imitar el daño en la zona pelúcida que sucede durante el procedimiento de transferencia nuclear. Estos embriones manipulados después se transfirieron a un receptor adecuado. Posteriormente el receptor se sacrificó y se evaluó el desarrollo de los embriones transferidos (Tabla 7).

TABLA 7

*Desarrollo embrionario e inducción de la preñez usando cigotos porcinos micromanipulados obtenidos in vivo. Se hicieron dos orificios por la pipeta de enucleación en la zona pelúcida para imitar la micromanipulación de transferencia nuclear. Los embriones después se transfirieron a los receptores*

| Nº de embriones de 1 célula "manipulados" transferidos | Resultados                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 48                                                     | Se recogieron 26 mórulas compactadas, y 15 embriones de 16 células en el día 6. Se cultivaron en NCSU-23 durante 24 horas. Se desarrollaron 29 embriones hasta la fase de blastocisto. |
| 34                                                     | Comprobación de preñez en abierto por sacrificio (SPC del inglés Slaughter/Pregnancy Check) en el día 21                                                                               |
| 35                                                     | Preñadas, SPC en el Día 21. Se observaron cuatro fetos y 5 sitios de reabsorción. Sin cuerpo lúteo (CL), estaban presentes nuevos folículos. Se perdería la preñez.                    |

Los embriones manipulados eran capaces de desarrollarse hasta blastocistos y fetos sanos.

#### *Fusión y Activación*

Para la activación, los ovocitos se colocaron entre dos electrodos paralelos en medio de activación de D-Sorbitol 0,3 M suplementado con MgSO<sub>4</sub> 0,1 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM en H<sub>2</sub>O, osmolalidad 280 mOsM. La activación se indujo por la aplicación de dos pulsos de CC de 1 kV/cm durante 60  $\mu$ segundos a intervalos de 5 s. Este procedimiento de activación promueve el desarrollo de embriones partenogénéticos a la fase de blastocisto (véase la siguiente Tabla 8). Sin embargo, puede usarse cualquier otro medio adecuado, por ejemplo, manitol 0,3 M, MgSO<sub>4</sub> 0,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,001 mM en agua destilada (Willadsen, 1986). Puede usarse cualquier pulso de activación adecuado, por ejemplo, 1 pulso de CC de 1,25 kV/cm durante 80  $\mu$ s. Para la fusión, los embriones manipulados se trataron de una manera similar con la adición de que la superficie de contacto entre el ovocito enucleado y la célula se dispuso paralela a los electrodos. La fusión se indujo por la aplicación de una corriente de CA de 3 V durante 5 segundos seguida de pulsos de CC de 1,0 kV/cm durante 60  $\mu$ s a intervalos de 5 segundos.

TABLA 8

*Desarrollo a la fase de blastocisto de ovocitos porcinos activados eléctricamente a diferentes edades*

| Edad del ovocito.    | 51,5 h (%) | 54 h (%)  | 57 h (%)  | 60 h (%)   |
|----------------------|------------|-----------|-----------|------------|
| Horas después de hCG |            |           |           |            |
| Experimento 1        | 1/13(8)    | 0/13      | 0/13 (0)  | 2/14 (14)  |
| Experimento 2        | 7/16 (44)  | 5/16 (31) | 8/16 (50) | 8/16 (50)  |
| Promedio             | 8/29 (28)  | 5/29 (17) | 8/29 (28) | 10/30 (33) |

#### *Cultivo y evaluación de embriones (todos los grupos)*

Después de la reconstrucción, los embriones pueden cultivarse por una diversidad de técnicas conocidas para los especialistas en la técnica incluyendo; cultivo *in vitro* en un medio adecuado o cultivo *in vivo* en el oviducto ligado de un hospedador receptor adecuado hasta una fase para la transferencia a un receptor sustituto final. Como alternativa, que es actualmente el procedimiento de elección, en especies porcinas aunque no es esencial, los embriones reconstruidos por la segunda fase pueden transferirse directamente al oviducto de un huésped receptor final sincronizado adecuado para el desarrollo a término (véanse las Tablas 9 y 10).

## ES 2 338 631 T3

TABLA 9

*Desarrollo de embriones porcinos por transferencia nuclear doble. Los embriones de la primera fase nuclear se reconstruyeron por piezo inyección de fibroblastos primarios diploides en ovocitos porcinos enucleados madurados in vivo. La segunda fase de la transferencia nuclear usó cigotos porcinos producidos in vivo. Los embriones reconstruidos se transfirieron al oviducto de una cerda receptora sincronizada y se recuperaron en el día 6 para evaluar el desarrollo*

| Grupo | Cantidad de fusiones intentadas | Cantidad de lisadas (%) | Cantidad de fusionadas (%) | Cantidad de blastocistos (%) |
|-------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 1     | 23 -fusiones                    | 0(0)                    | 13/23 (57)                 | 4 (31)                       |

TABLA 10

*Resultado de la preñez después de la transferencia de embriones por transferencia nuclear doble directamente a un receptor final sincronizado*

| Réplica | Número de embriones transferidos | Preñez y comentarios     |
|---------|----------------------------------|--------------------------|
| 1       | 48                               | Preñada d28, abierta d34 |
| 2       | 4                                | Abierta d28, abierta d35 |
| 3       | 4                                | Abierta d28, abierta d35 |
| 4       | 9                                | No analizado             |

*Procedimiento de sincronización para la preparación de receptores sustitutos para los embriones reconstruidos por transferencia nuclear*

El mismo procedimiento que el usado para la preparación de cigotos con las siguientes diferencias, sin eCG, sin IA y 1,5 días después.

*Procedimiento para el mantenimiento de la preñez en receptores sustitutos*

Para mantener la preñez en el receptor final, los embriones producidos *in vivo* en la misma fase del desarrollo que los embriones reconstruidos pueden transferirse con los embriones de transferencia nuclear. Como alternativa, que es lo que se prefiere actualmente en especies porcinas, el receptor final puede tratarse hormonalmente para mantener la preñez del siguiente modo, eCG (1000 IU) en el día 9 o día 10 de preñez, hCG (500 IU) de 3 a 3,5 días después.

Ejemplo 10

*Generación de cerdos clonados usando células somáticas como donantes nucleares*

*Aislamiento de células de la granulosa porcinas*

Se recogieron células de la granulosa de folículos ováricos por aspiración con aguja del fluido folicular. Los animales de los que se recogieron los ovarios se prepararon de forma idéntica a los usados para la recogida de ovocitos (véase recuperación de ovocitos a continuación). Los folículos se aspiraron por penetración a través de la corteza del ovario usando una aguja hipodérmica de calibre 18 unida a una jeringa de 10 ml. Se recogió el fluido folicular de folículos entre 2 y 5 mm de diámetro, se puso en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml, y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. El sedimento celular se resuspendió en DMEM (Gibco), que contenía FCS al 10% (Summit Biotech), NEAA, 2 ng/ml de bFGF y 6 µl/ml de gentamicina. Las células se expandieron durante varios días y después se criopreservaron.

## ES 2 338 631 T3

### *Preparación de células para transferencia nuclear*

Las células donantes se sembraron a  $1-5 \times 10^4$  células por placa de 35 mm y se dejó que alcanzaran el 100% de confluencia en medio DMEM suplementado con NEAA (0,1 mM), bFGF (2 ng/ml), y suero bovino fetal al 10%. Se eligió la inhibición por contacto para la sincronización celular para maximizar la cantidad de células sanas con un contenido de ADN diploide. Véanse los datos del ciclo celular para los detalles.

Las células se recogieron mediante tratamiento con tripsina y se almacenaron en suspensión en una versión tamponada con fosfato libre de calcio del medio NCSU-23 a 38,5°C durante 20-120 minutos, antes de su uso como donantes nucleares.

### *Análisis del ciclo celular (células de la granulosa)*

Como se usaron ovocitos MII como citoplastos receptores para la primera etapa de la transferencia nuclear (TN), se eligieron células donantes que tenían un contenido de ADN diploide para mantener la coordinación apropiada de la ploidía del embrión reconstruido resultante. La posición dentro del ciclo celular de diversas poblaciones de células después de 8 días de cultivo, se determinó midiendo el contenido de ADN usando citometría de flujo. Se analizaron tres poblaciones: células de la granulosa en crecimiento activo sub-confluentes, células de la granulosa inhibidas por contacto, y células de la granulosa privadas de suero durante 48 horas.

Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 11. Se observó que después de la privación de suero, la población celular de la granulosa contenía una gran proporción (7,2%) de estructuras que tienen un contenido de ADN inferior al coherente con una célula en G1 (eran sub-G1). Estas estructuras son características de células que experimentan apoptosis y senescencia, y por tanto indicaban que las células de la granulosa no toleraban muy bien la privación de suero. La sincronización de las células por inhibición por contacto (100% confluentes) era más eficaz, dado que una mayor proporción de células estaba en G1/G0 (90,3%), y había menos células sub-G1 apoptóticas en la población (solamente el 1,6%).

TABLA 11

*Análisis del ciclo celular de células de la granulosa. Los valores se expresan como el porcentaje de la cantidad total de células en la población*

| Fase del ciclo celular | No privadas | Privadas de suero | 100% Confluentes |
|------------------------|-------------|-------------------|------------------|
| G1/G0                  | 78,8        | 82,3              | 90,3             |
| S                      | 3,7         | 1,9               | 2,2              |
| G2/M                   | 13,9        | 6,7               | 4,5              |
| Sub G1                 | 0,7         | 7,2               | 1,6              |

### *Sincronización y superovulación de lechonas para la recuperación de ovocitos y cigotos*

#### *Recuperación de ovocitos*

Lechonas de estirpe cruzada (127,01-145,15 kg (280-320 lbs.)) se sincronizaron, se superovularon y se recogieron los ovocitos. Las lechonas se sincronizaron por administración oral de 18-20 mg de Regu-Mate (Altrenogest, Hoechst) mezclado en el pienso. El Regu-Mate se suministró durante 5-14 días usando un esquema que depende de la fase del ciclo estral. Se administró Estrumate (250 µg, Bayer) IM el último día del tratamiento con Regu-Mate. La superovulación se indujo con una inyección IM de 1600 IU de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, Diosynth) 15-17 horas después del último suministro de Regu-Mate. Se administraron 1500 unidades de gonadotropina coriónica humana (hCG, Intervet America) IM 82 horas después de la inyección de PMSG. Los ovocitos se recogieron 50-52 horas después de la inyección de hCG usando solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco que contenía BSA (4 g/l).

#### *Mantenimiento de la preñez*

La preñez se mantuvo usando una combinación de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) y gonadotropina coriónica humana (hCG). Se inyectó IM PMSG (1000 IU) en el d10 del ciclo estral, siendo el d1 el día del celo. Se inyectó IM gonadotropina coriónica humana de 3 a 3,5 días después, en el d13 del ciclo.



*Recuperación de cigotos*

Lechonas de estirpe cruzada (127,01-145,15 kg (280-320 lbs.)) se sincronizaron, se superovularon y se recogieron los cigotos. Las lechonas se sincronizaron por administración oral de 18-20 mg de Regu-Mate (Altrenogest, Hoechst) mezclado en el pienso. El Regu-Mate se suministró durante 5-14 días; dependiendo de la fase del ciclo estral en el que estaban las lechonas. Se administró IM Estrumate (250 g, Bayer) el último día del tratamiento con Regu-Mate. La superovulación se indujo por una inyección IM de 1600 IU de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, Diosynth) 15-17 horas después del último suministro de Regu-Mate. Se administraron 1500 unidades de gonadotropina coriónica humana (hCG, Intervet America) 78 horas después de la inyección de PMSG. Las lechonas después se inseminaron artificialmente o se reprodujeron de forma natural 24-36 horas después de la inyección de hCG. Los cigotos se recogieron 52-54 horas después de la inyección de hCG usando solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco que contenía BSA (4 g/l).

*Enucleación de ovocitos*

Los ovocitos recuperados se mantuvieron a 38°C, se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 4 g/l de BSA y se transfirieron a medio NCSU-23 tamponado con fosfato libre de calcio, a 38°C. Para eliminar los cromosomas (enucleación), los ovocitos primero se colocaron en medio NCSU-23 tamponado con fosfato libre de calcio que contenía 5 µg/ml de citocalasina B (Sigma) (la citocalasina B es opcional) y 7,5 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma) a 38°C durante 20 minutos. Después se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma desde directamente por debajo del primer cuerpo polar usando una pipeta de vidrio de 18 µM. La enucleación se confirmó exponiendo la parte aspirada del citoplasma en la pipeta a luz UV, y comprobando la presencia de una placa metafásica.

*Reconstrucción de embriones (Día 1)*

Se enuclearon grupos de 10-20 ovocitos y se colocaron en gotas de 20 µl de la versión tamponada con fosfato libre de calcio del medio NCSU-23 a 38°C en aceite mineral (SIGMA). A las 53-56 horas después de la inyección de hCG, una única célula se puso bajo la zona pelúcida en contacto con el citoplasma enucleado. El pareado se transfirió a la cámara de fusión (nº de modelo BT-453, BTX Inc. San Diego, CA) que contenía 700 µl de manitol 0,3 M, MgSO<sub>4</sub> 0,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM en agua desionizada. La fusión y la activación se indujeron por la aplicación de un pulso de CA de 5 V durante 5 segundos seguido de 2 pulsos de CC de 1,5 kV/cm durante 60 µs usando un manipulador celular eléctrico (Electrocell Manipulator) ECM2001 (BTX Inc., San Diego, CA). Los duplicados después se lavaron en medio NCSU-23 tamponado con bicarbonato, y se incubaron en este medio durante 0,5-1 horas a 38,6°C en una atmósfera humidificada que constaba de CO<sub>2</sub> al 5% en aire. Los duplicados después se comprobaron para la fusión a un aumento 300X usando un microscopio invertido. Los embriones reconstruidos fusionados se activaron artificialmente usando 2 pulsos sucesivos de CC de 1,2 kV/cm durante 60 µs cada uno, y se cultivaron durante una noche.

*Transferencia nuclear doble (segundo día)*

El procedimiento de transferencia nuclear doble se refiere a la reconstrucción de cigotos enucleados en el día 2, usando núcleos producidos por la transferencia nuclear del día 1. Evaluación de la formación nuclear desde el día previo (día 1) de transferencia nuclear:

Los embriones reconstruidos a partir del día previo de transferencia nuclear se retiraron del cultivo y se centrifugaron en una Biofuge a 13.000 rpm durante 15 min. para observar la formación de núcleo. Los embriones se evaluaron para la presencia de un pseudo-pronúcleo por observación a 300X usando un microscopio invertido. Los embriones con un pseudo-pronúcleo se almacenaron, se contaron, y se colocaron de nuevo en una placa de cultivo que contenía NCSU-23 en una incubadora a 38,6°C, con CO<sub>2</sub> al 5% en aire.

*Enucleación de cigotos*

Los cigotos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min. en una centrífuga Biofuge 13. Los cigotos después se colocaron en medio NCSU-23 tamponado con fosfato que contenía 5,0 µg/ml de citocalasina B (Sigma) a 38°C, y se incubaron durante 20 minutos. Los cigotos fertilizados con 2 pronúcleos se usaron para la enucleación.

Para eliminar los núcleos, se insertó una pipeta de enucleación (25-35 µm) a través de la zona pelúcida y al interior del citoplasma, de modo que la abertura de la pipeta de enucleación estuviera cerca de los pronúcleos. Se aspiraron ambos pronúcleos y los cuerpos polares aplicando lentamente presión negativa sobre la línea de enucleación.

## ES 2 338 631 T3

### *Reconstrucción de cigotos enucleados*

Los embriones reconstruidos del día 1 se colocaron en medio NCSU-23 tamponado con fosfato que contenía citocalasina B y Nocodazol. Se usó una pipeta de enucleación de 30-45  $\mu\text{m}$  para la manipulación. Los carioplastos se prepararon aspirando el pseudo-pronúcleo con el mínimo citoplasma adyacente. Estos carioplastos se expulsaron lentamente al interior del espacio perivitelino de los cigotos enucleados. Los duplicados se transfirieron a la cámara de fusión que contenía 700  $\mu\text{l}$  de medio SOR2. La fusión se indujo por aplicación de un pulso de CA de 5 V durante 5 segundos seguido de 2 pulsos de CC de 1,2 kV/cm durante 60  $\mu\text{s}$ . Los duplicados después se lavaron con medio NCSU-23, se incubaron en este medio durante 0,5-1 horas a 38,6°C, CO<sub>2</sub> al 5%, y después se comprobaron para la fusión. Los duplicados fusionados se transfirieron lo antes posible al oviducto de una lechona receptora de celo sincronizado. Los resultados de la transferencia nuclear usando células primarias de la granulosa se resumen en la Tabla 12.

TABLA 12

*Transferencia nuclear usando células de la granulosa porcinas*

|                                                                                                                                                                                               |                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Nº de embriones reconstruidos - Día 1                                                                                                                                                         | 196            |
| Nº de embriones fusionados - Día 1 (%)                                                                                                                                                        | 124/183(68)    |
| Nº de embriones reconstruidos - Día 2                                                                                                                                                         | 74             |
| Nº de embriones fusionados - Día 2 (%)                                                                                                                                                        | 72/74 (97)     |
| Nº de embriones transferidos al receptor                                                                                                                                                      | 72             |
| Nº de fetos detectados en el día 29 por exploración por ultrasonidos                                                                                                                          | 3 <sup>1</sup> |
| Nº de fetos detectados en el día 42 por exploración por ultrasonidos                                                                                                                          | 2 <sup>2</sup> |
| <sup>1</sup> al menos 3 fetos; <sup>2</sup> al menos 2 fetos. Fue difícil determinar el número exacto de fetos por ultrasonidos en cerdos debido a la posición anatómica del útero del cerdo. |                |

Imágenes de ultrasonidos confirmaron la preñez en el día 29 y el día 42 de gestación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de transferencia nuclear que comprende:

(a) preparar una célula somática no humana para la transferencia nuclear por un procedimiento que comprende modificar el material genético de la célula somática no humana mediante un acontecimiento de modificación génica dirigida en un locus endógeno; y

(b) transferir el material genético desde la célula somática no humana hasta una célula receptora no humana.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el acontecimiento de modificación génica dirigida está mediado por recombinación homóloga.

3. Un procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la modificación es inactivación, eliminación o modificación de un gen; regulación positiva de un gen, reemplazo génico o colocación de transgenes.

4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el acontecimiento de modificación génica dirigida produce una proporción de clon celular con modificación génica dirigida: clon celular modificado aleatoriamente igual a o mayor que 1:100.

5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el acontecimiento de modificación génica dirigida se realiza en un locus expresado abundantemente en la célula somática huésped.

6. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que un gen estructural se coloca adyacente a un promotor endógeno.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el promotor endógeno es el del gen del colágeno.

8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el promotor endógeno es el del gen de la proteína de la leche.

9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el promotor endógeno dirige la expresión abundante en células fibroblásticas.

10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el promotor endógeno dirige la expresión abundante en células endoteliales.

11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el acontecimiento de modificación génica dirigida está mediado por lipofección.

12. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el acontecimiento de modificación génica dirigida implica el uso de un vector dirigido al gen, en el que el vector comprende una región larga de homología con el locus diana.

13. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el acontecimiento de modificación génica dirigida implica el uso de un vector dirigido al gen que está en forma circular.

14. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el acontecimiento de modificación génica dirigida incluye la inducción artificial de expresión génica o la inducción de cambios en la cromatina en la célula.

15. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el acontecimiento de modificación génica dirigida está facilitado por un agente que inhibe la desacetilación de histonas o por la expresión en la célula de un factor que estimula la transcripción en el locus diana.

16. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la célula somática no humana es una célula somática primaria.

17. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la célula somática no humana es una célula epitelial o una célula fibroblástica o una célula endotelial o una célula muscular.

18. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la transferencia del material genético desde la célula somática no humana hasta una célula receptora no humana proporciona un embrión animal no humano.

## ES 2 338 631 T3

19. Un procedimiento, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende adicionalmente la producción de una población celular clonada totipotente o pluripotente no humana.

5 20. Un embrión no humano transgénico o un feto no humano transgénico que se puede obtener mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el genoma contiene ADN exógeno.

21. Una célula no humana transgénica obtenida del embrión no humano o del feto no humano de la reivindicación 20.

10 22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que se usa una célula del embrión animal no humano para transferencia nuclear adicional.

15 23. Un procedimiento para preparar un animal no humano transgénico, que comprende causar que un animal no humano se desarrolle a término a partir del embrión no humano de acuerdo con la reivindicación 20 y, opcionalmente, reproducirlo a partir del animal.

24. Un animal transgénico que se puede obtener por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23.

20 25. Un animal transgénico de acuerdo con la reivindicación 24 que es una oveja, una vaca, un toro, una cabra, un cerdo, un caballo, un camello, un conejo, o un roedor.

26. Un animal transgénico que se reproduce a partir de un animal de acuerdo con la reivindicación 24 o la reivindicación 25.

25 27. Un procedimiento para obtener una población celular pluripotente o totipotente no humana clonal que comprende cultivar una línea celular a partir de un embrión transgénico no humano o de un feto transgénico no humano de acuerdo con la reivindicación 20.

30 28. Una población celular pluripotente o totipotente no humana clonal que se puede obtener de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27.

35

40

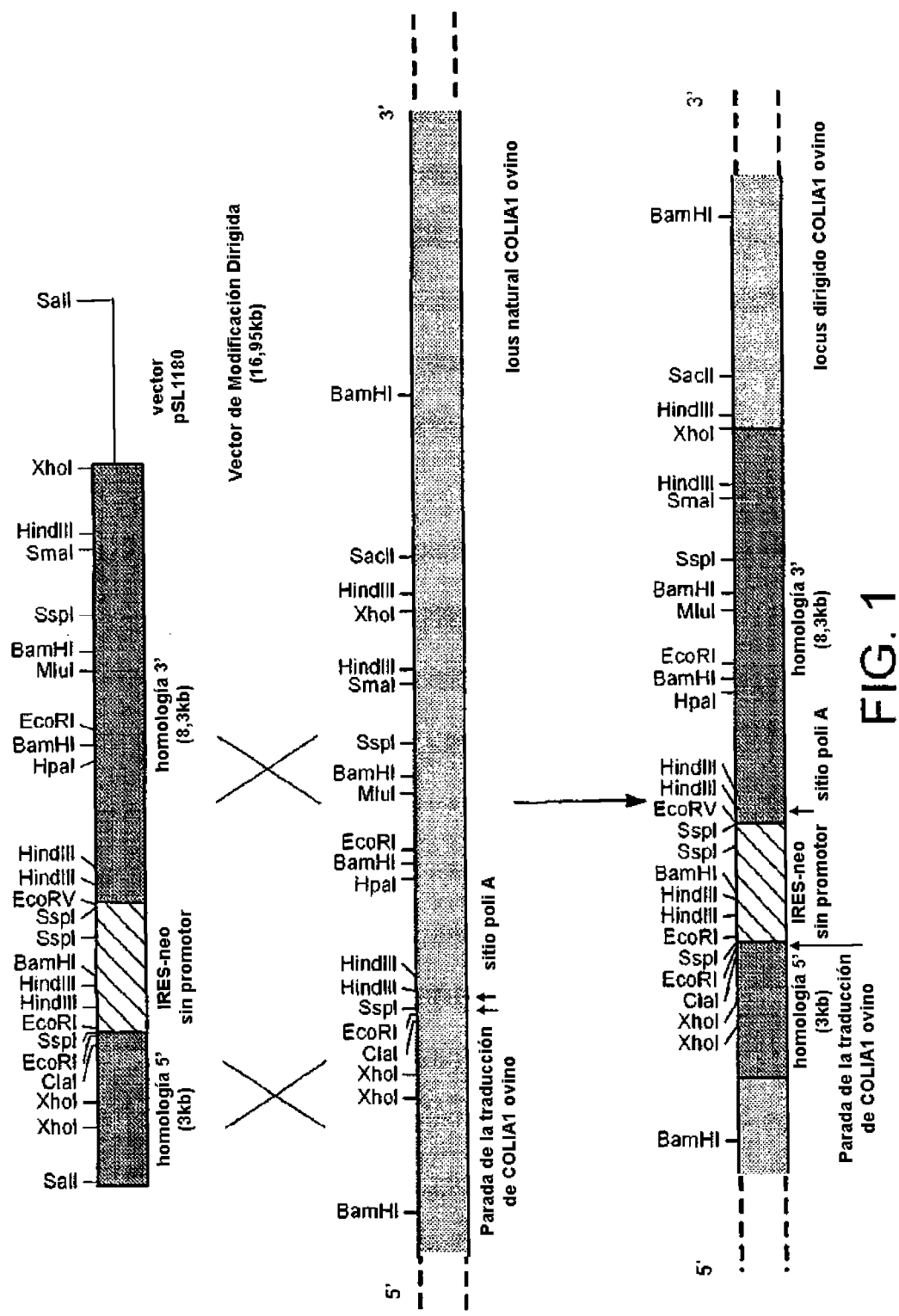
45

50

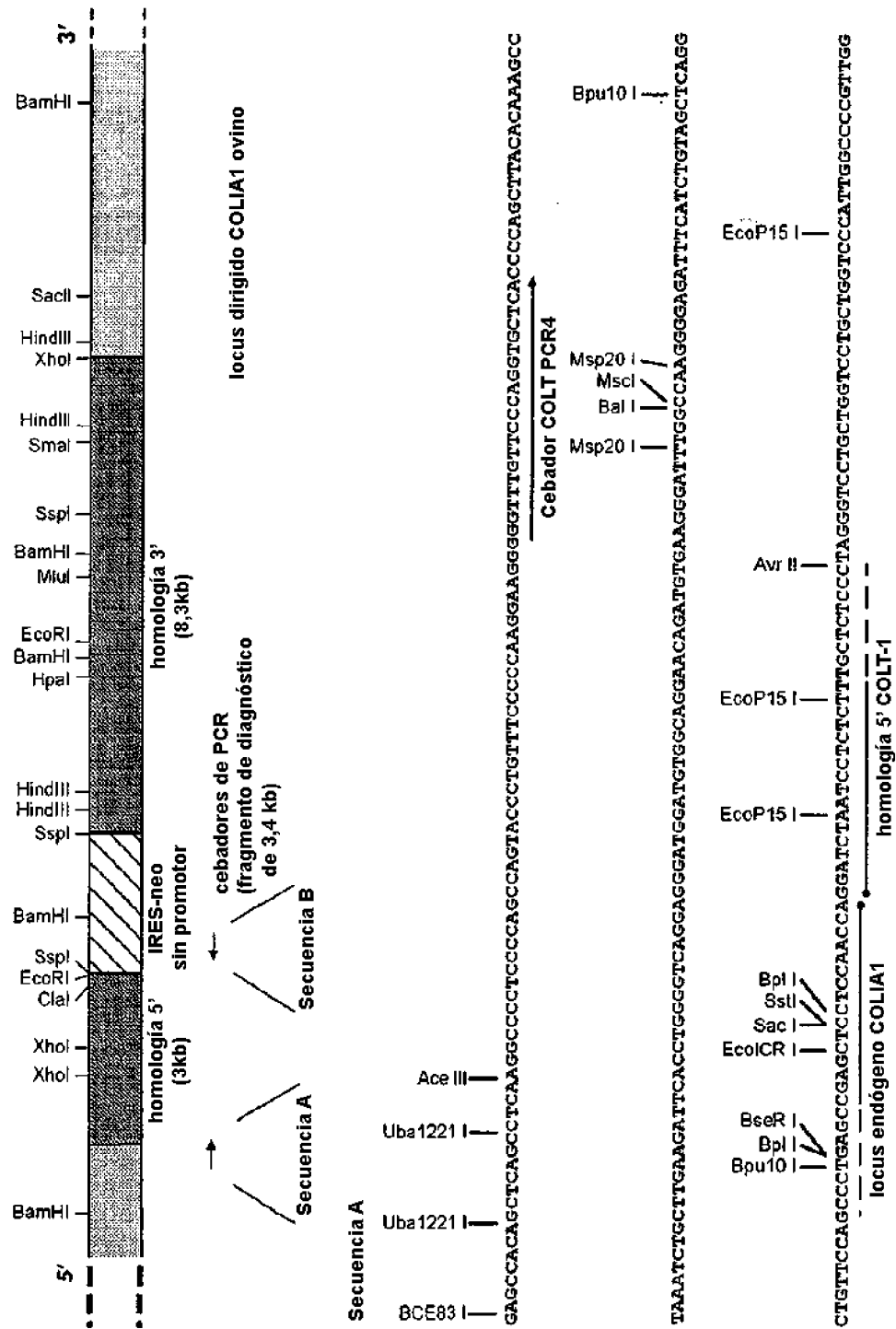
55

60

65



**FIG. 2**



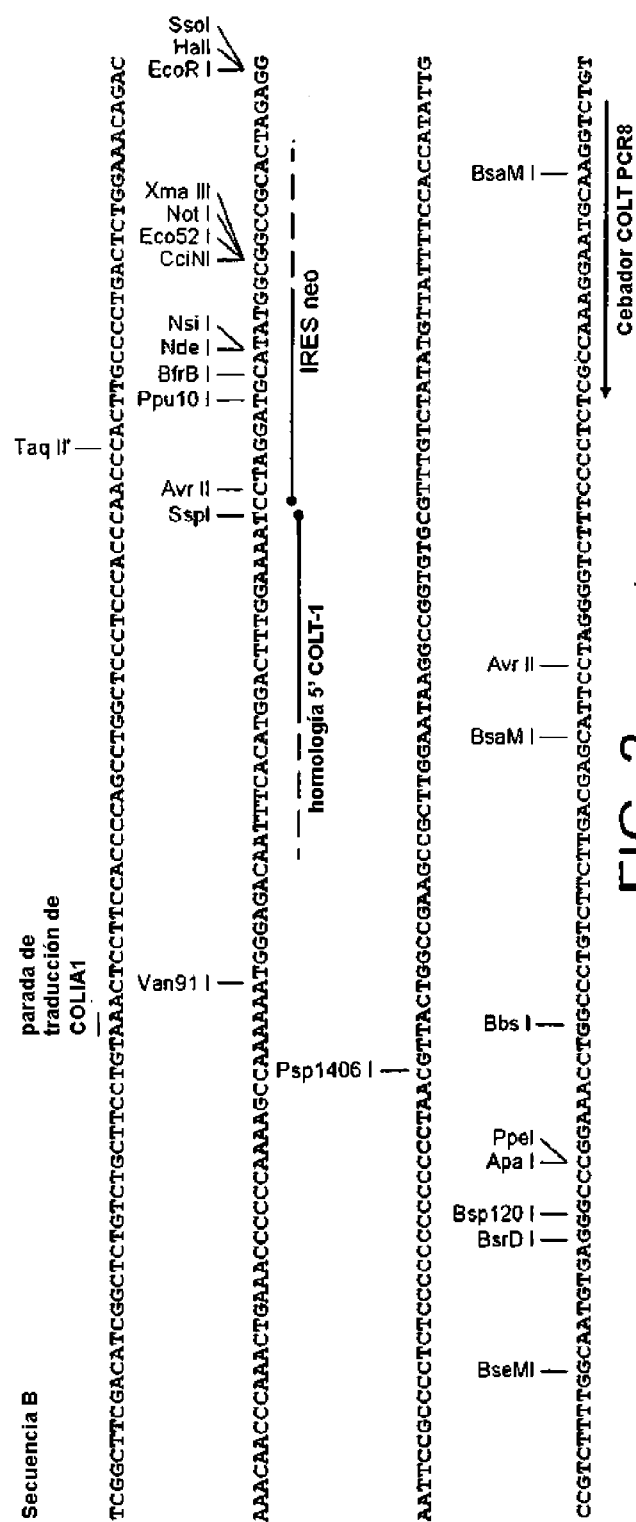


FIG. 2 CONTINUACIÓN

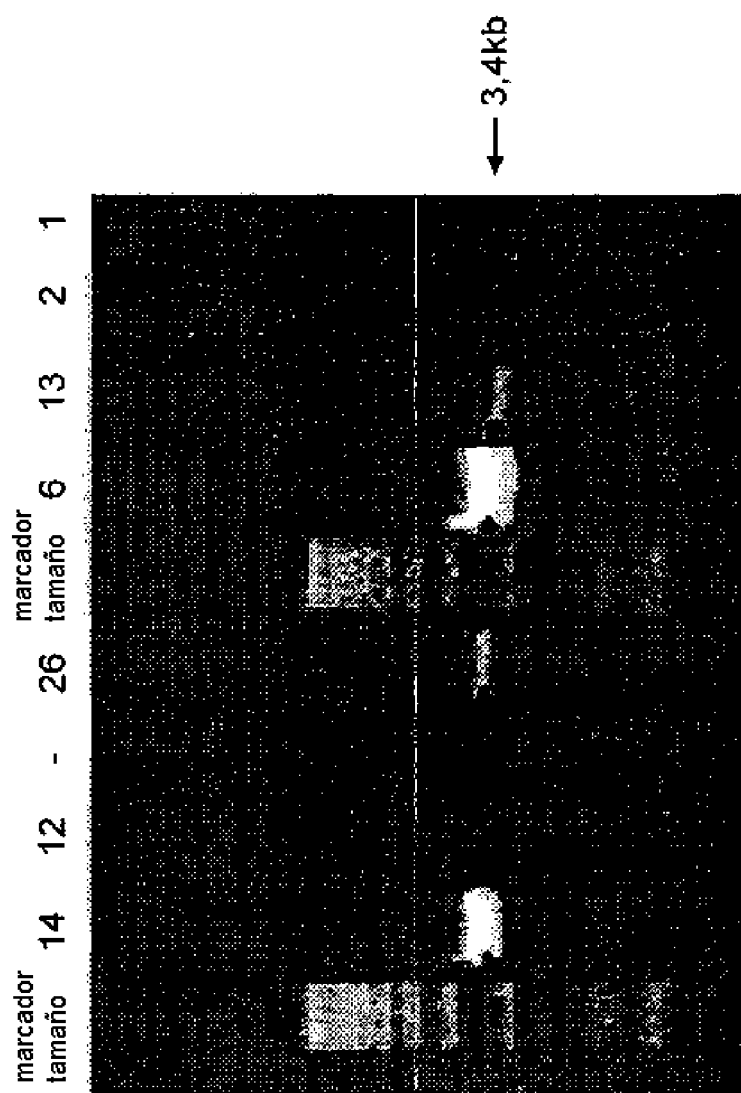
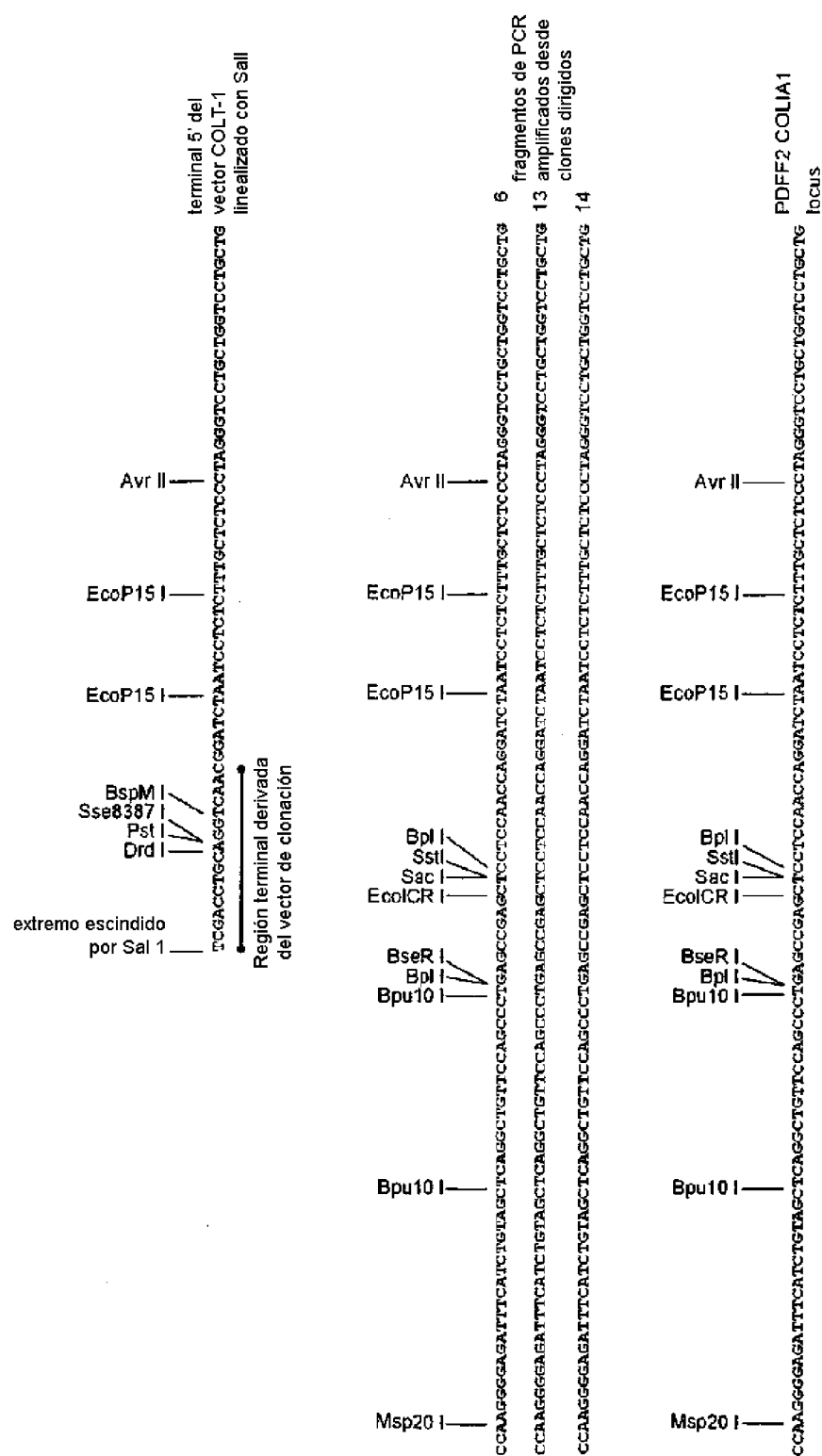


FIG. 3





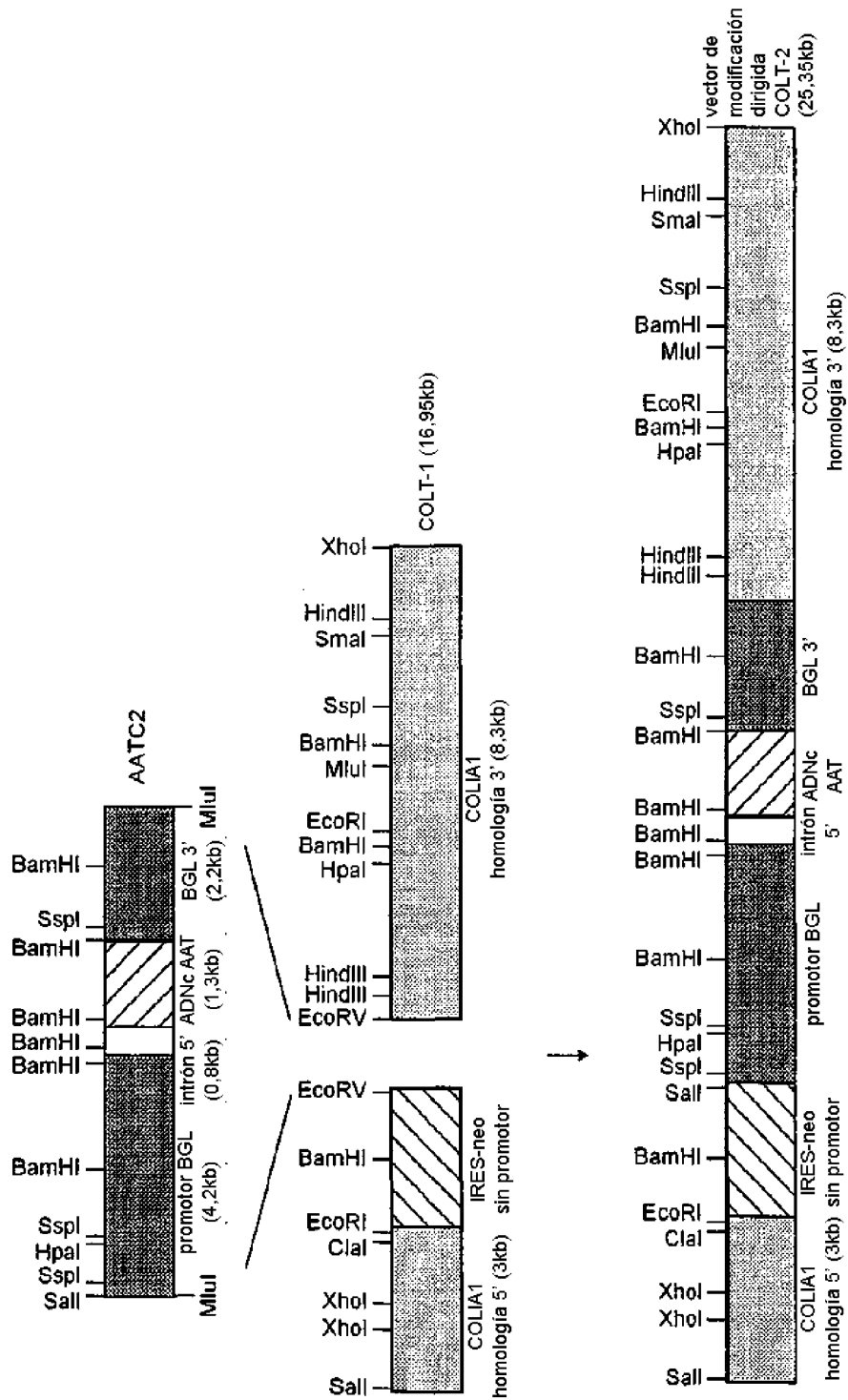
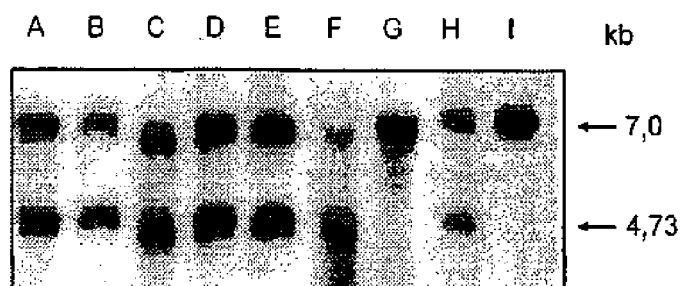


FIG. 5

FIG. 6



Clave para los carriles

Corderos dirigidos con COLT1  
(transferencia nuclear desde el clon celular PDCOL6)

- A. cordero vivo nacido de la oveja 941235
- B. cordero nacido muerto de la oveja 9600356
- C. cordero vivo nacido de la oveja 950030
- D. cordero nacido muerto de la oveja 941053

Corderos dirigidos con COLT2  
(transferencia nuclear desde el clon celular PDCAAT90)

- E. cordero nacido muerto de la oveja NZ1418
- F. cordero vivo nacido de la oveja 941026

- G. cordero de tipo silvestre
- H. clon celular PDCAAT90
- I. células PDFF2 no transfectadas

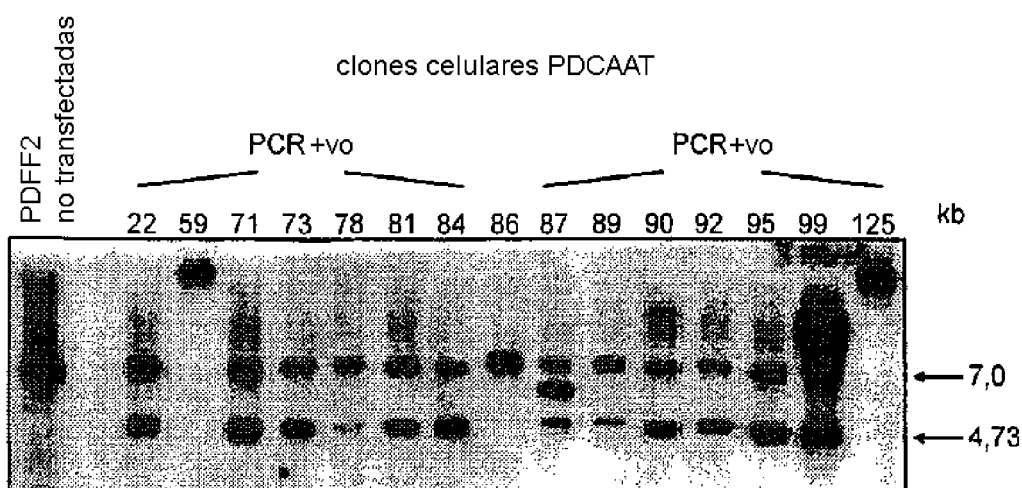


FIG. 8

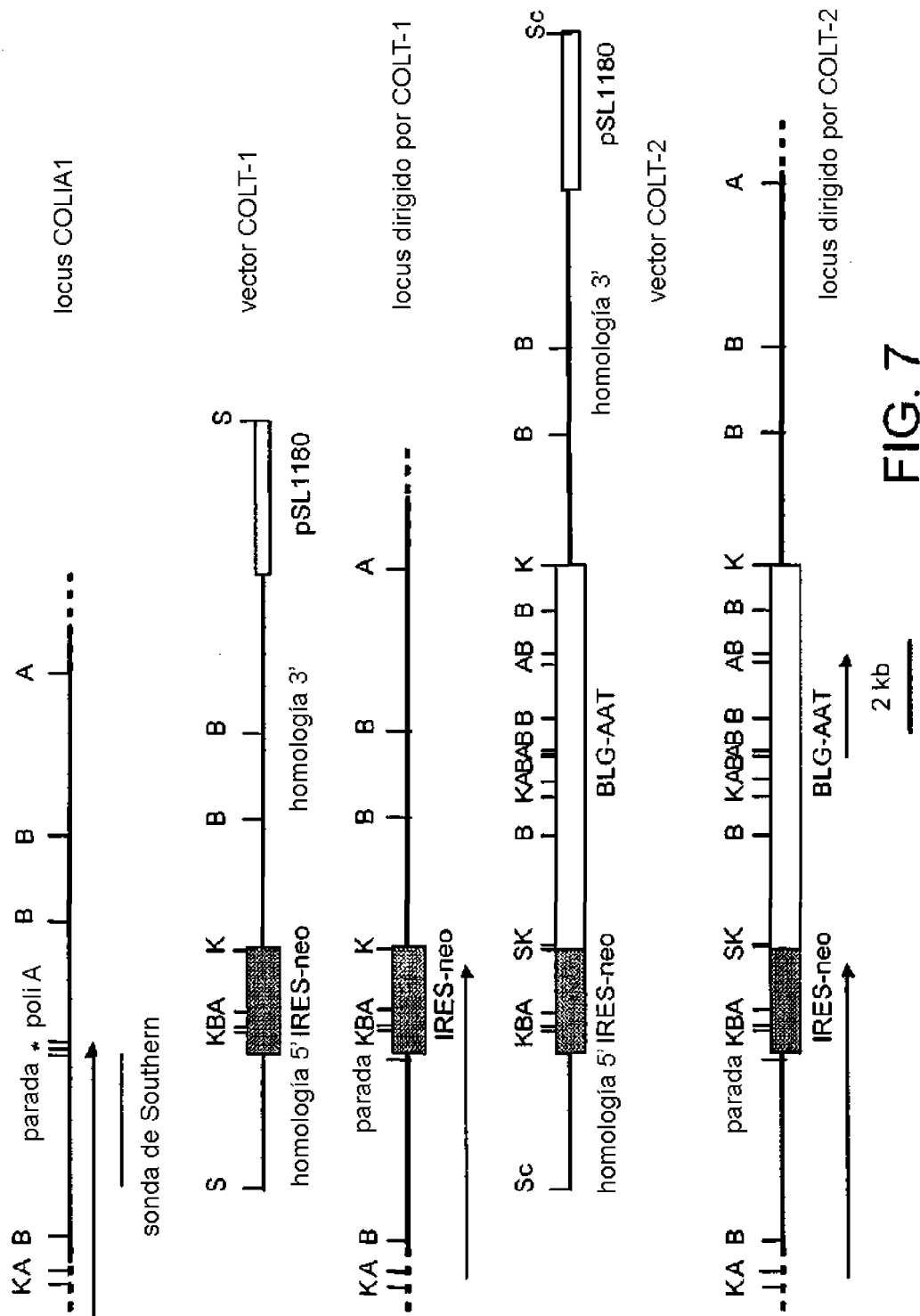


FIG. 7

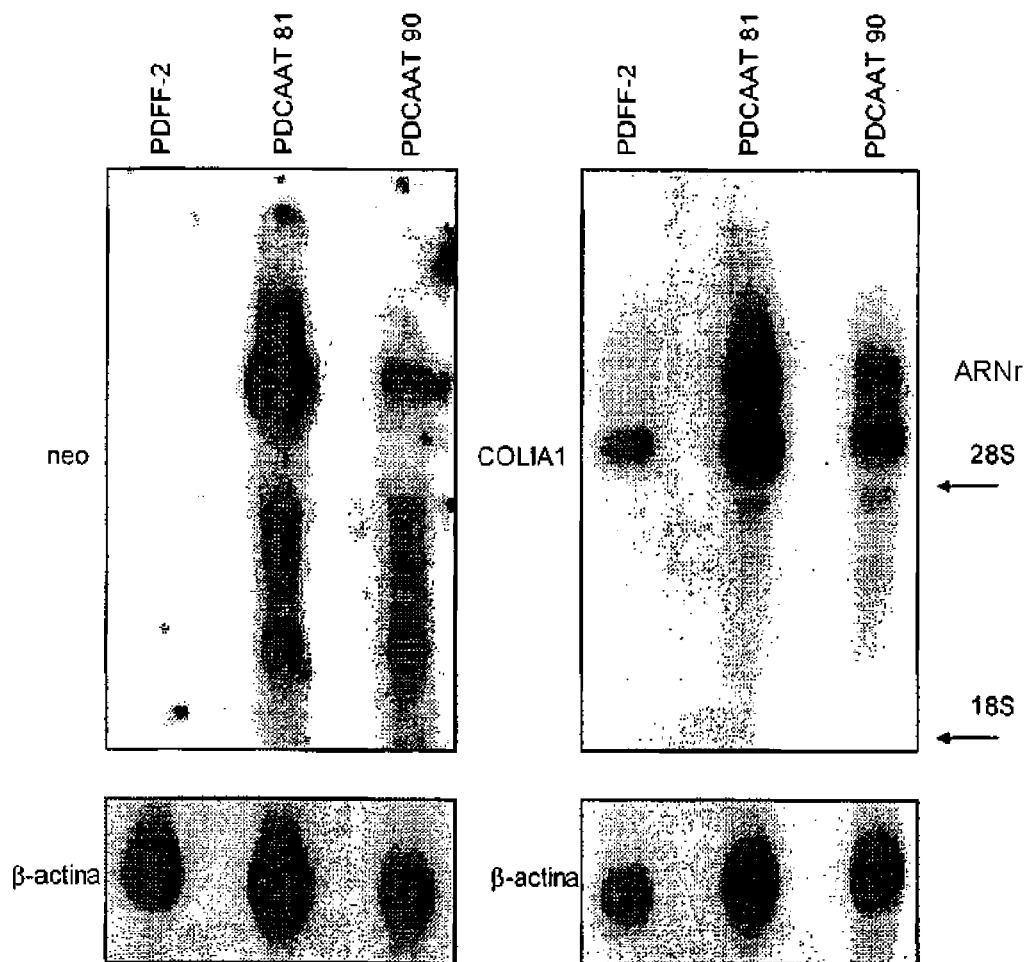


FIG. 9

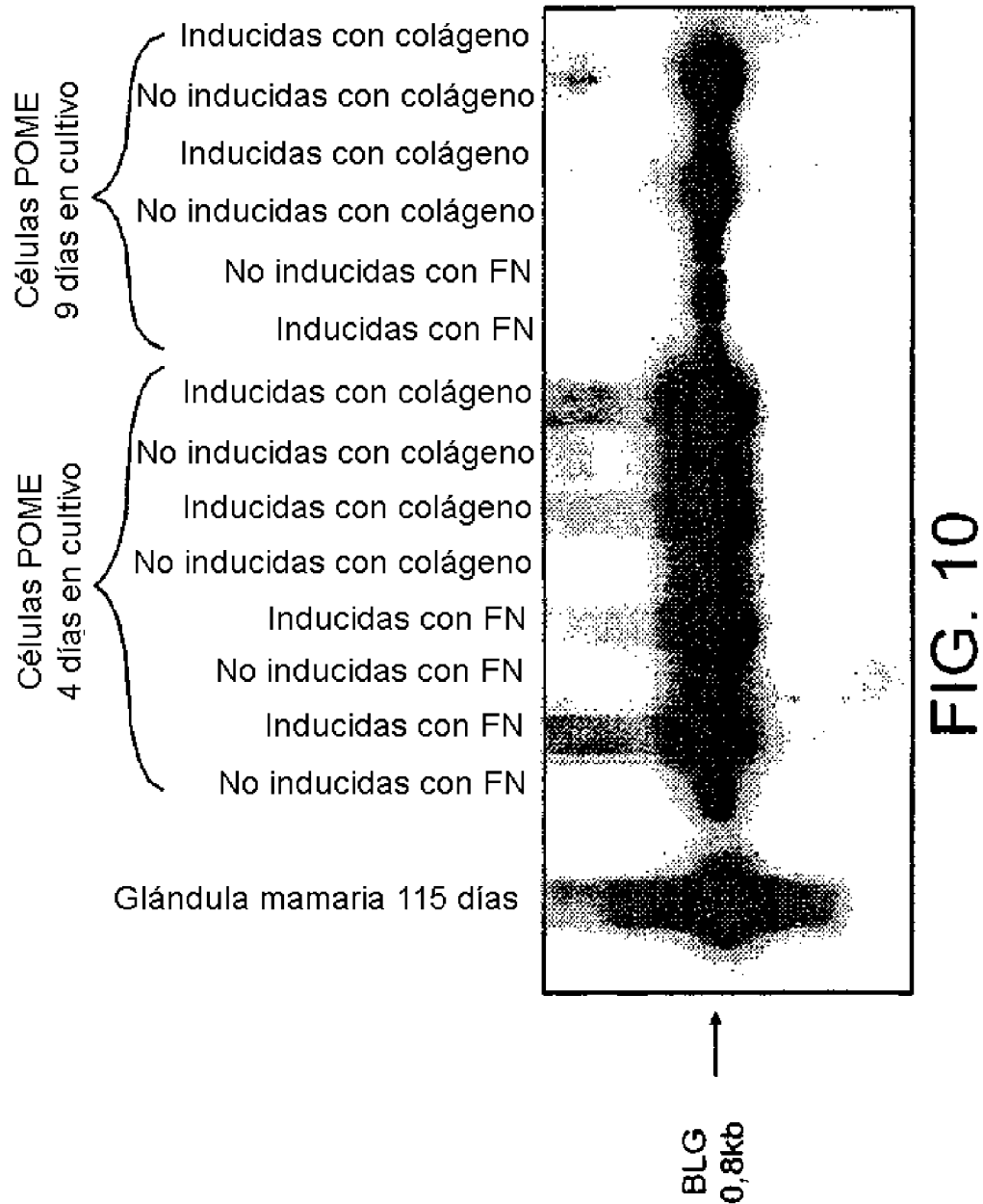


FIG. 10

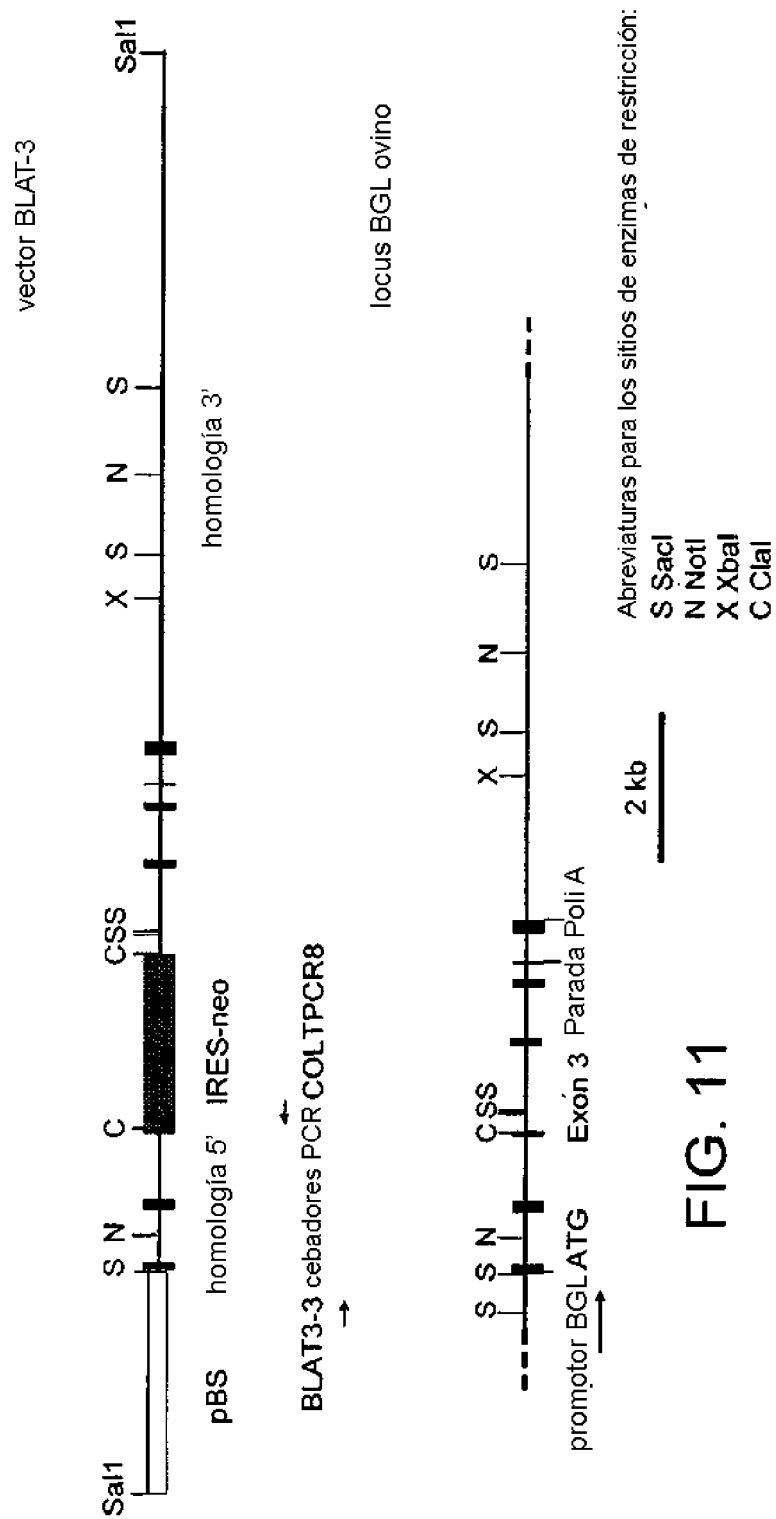


FIG. 11

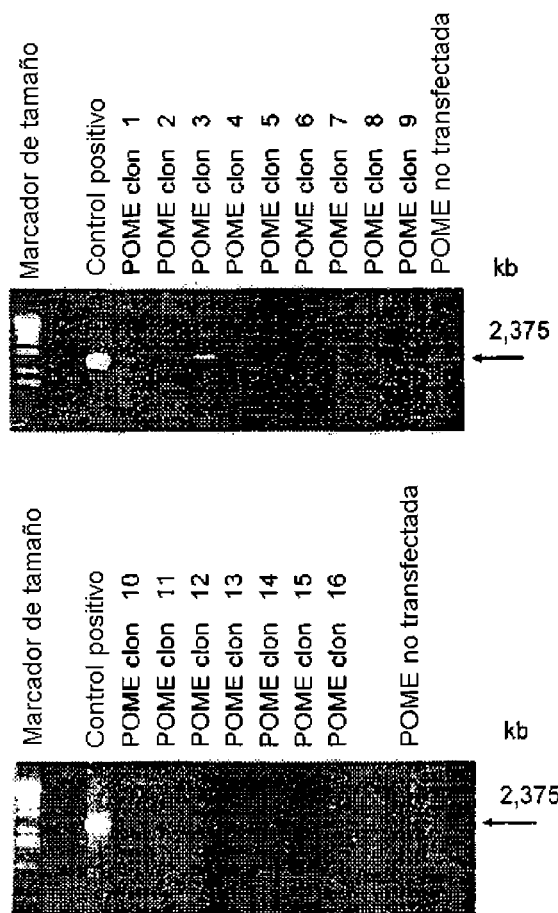


FIG. 12

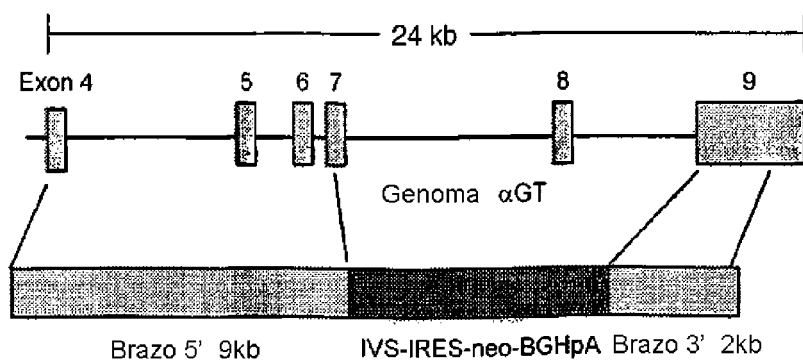
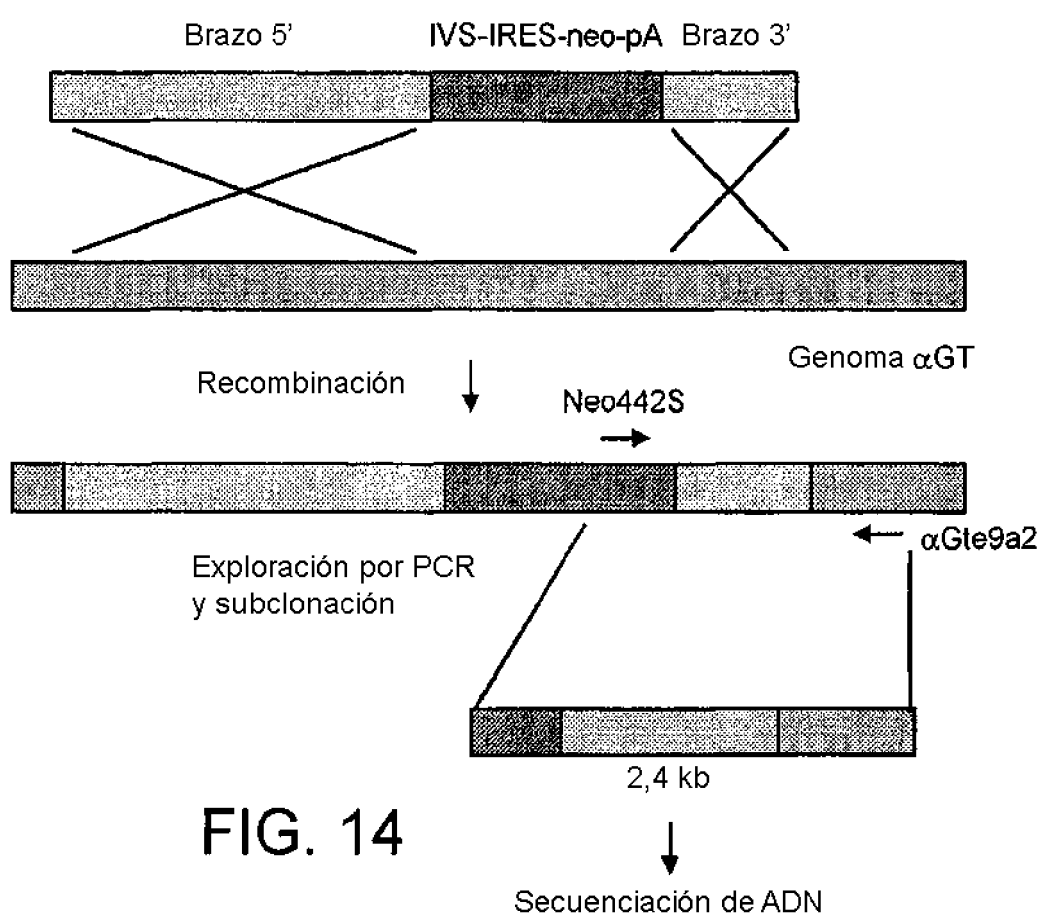


FIG. 13





**FIG. 14**

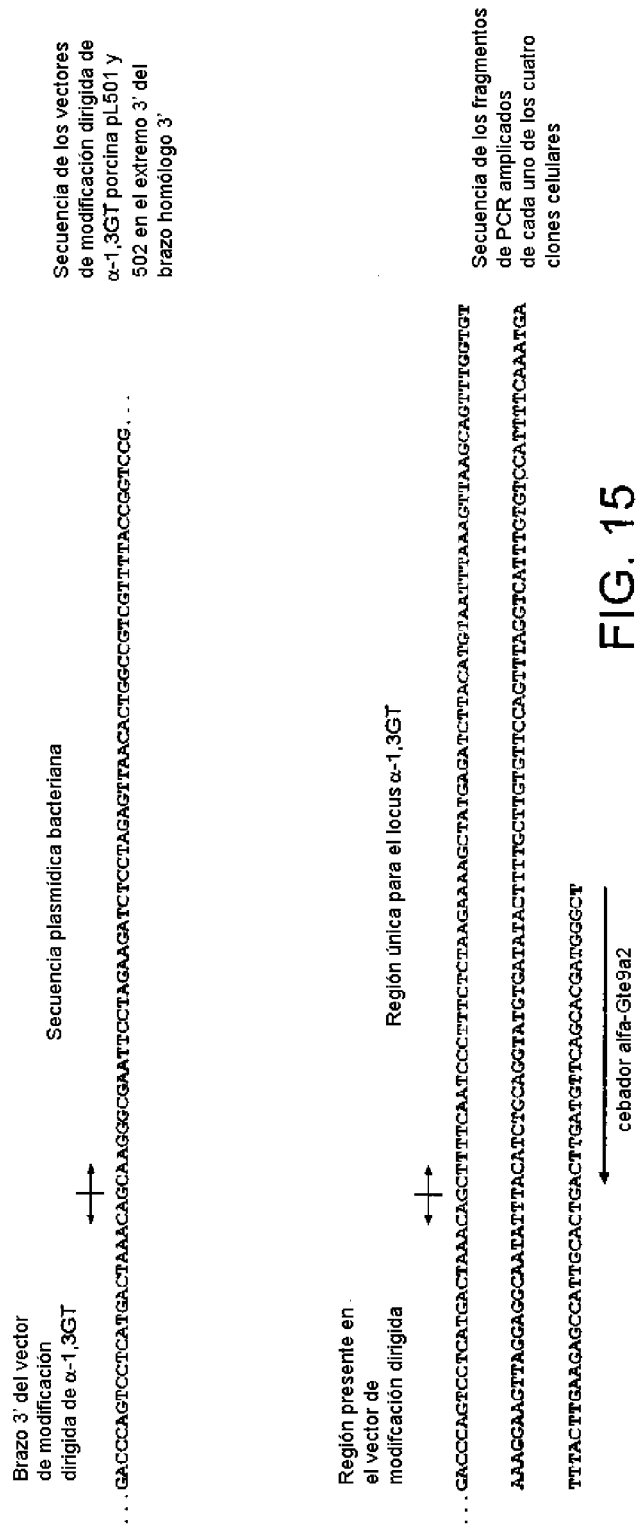
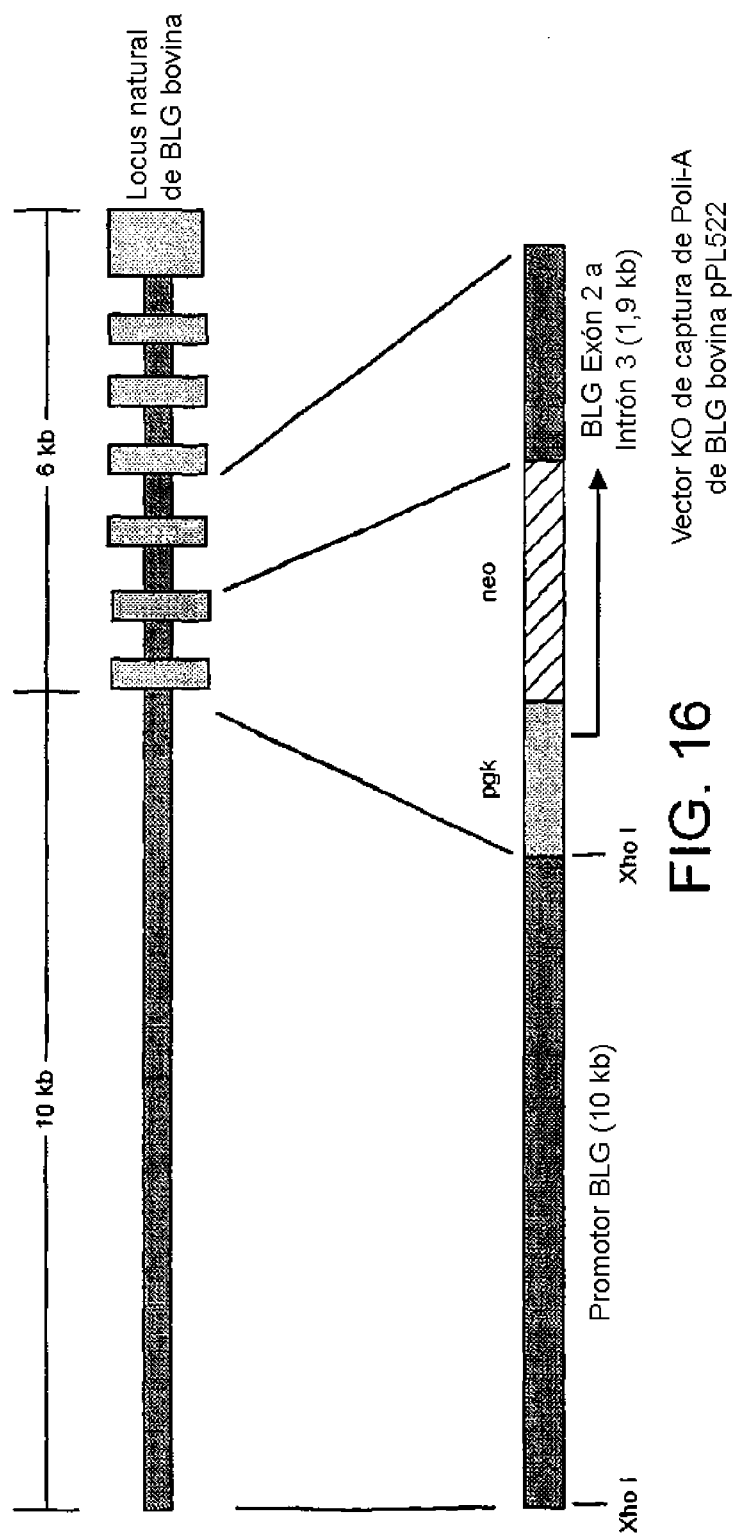


FIG. 15



**FIG. 16**

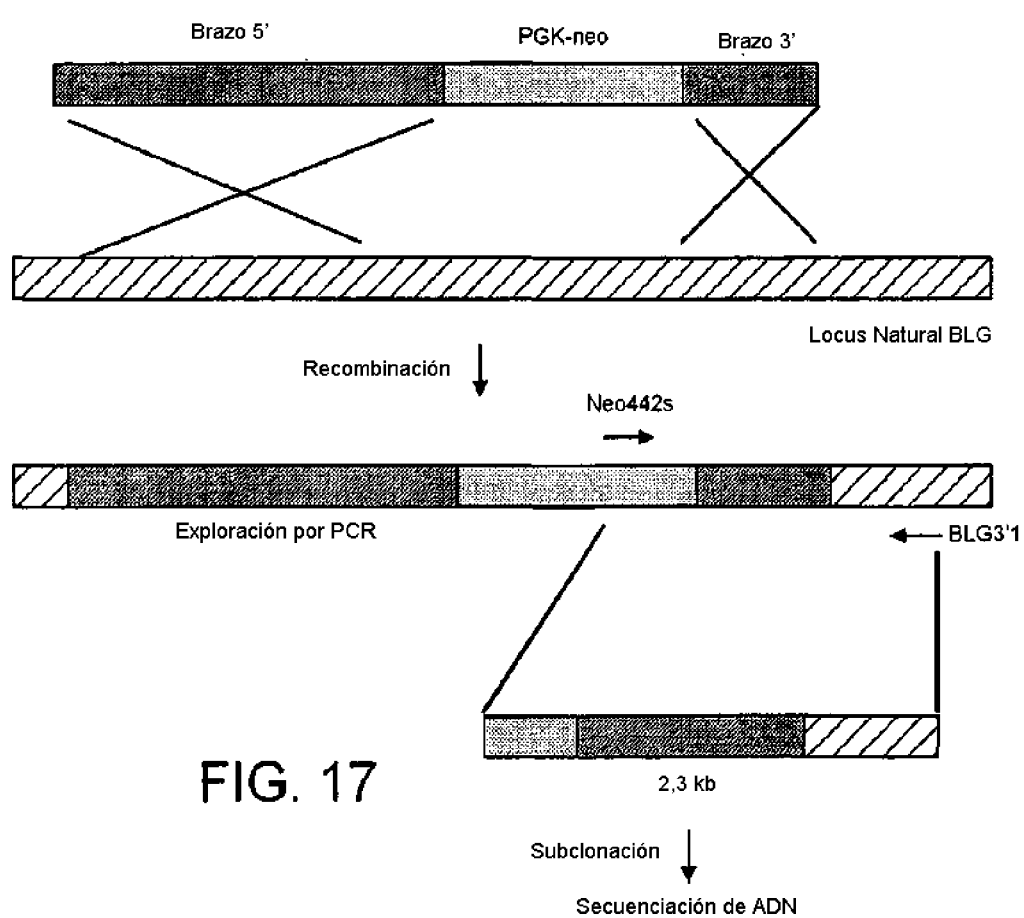


FIG. 17

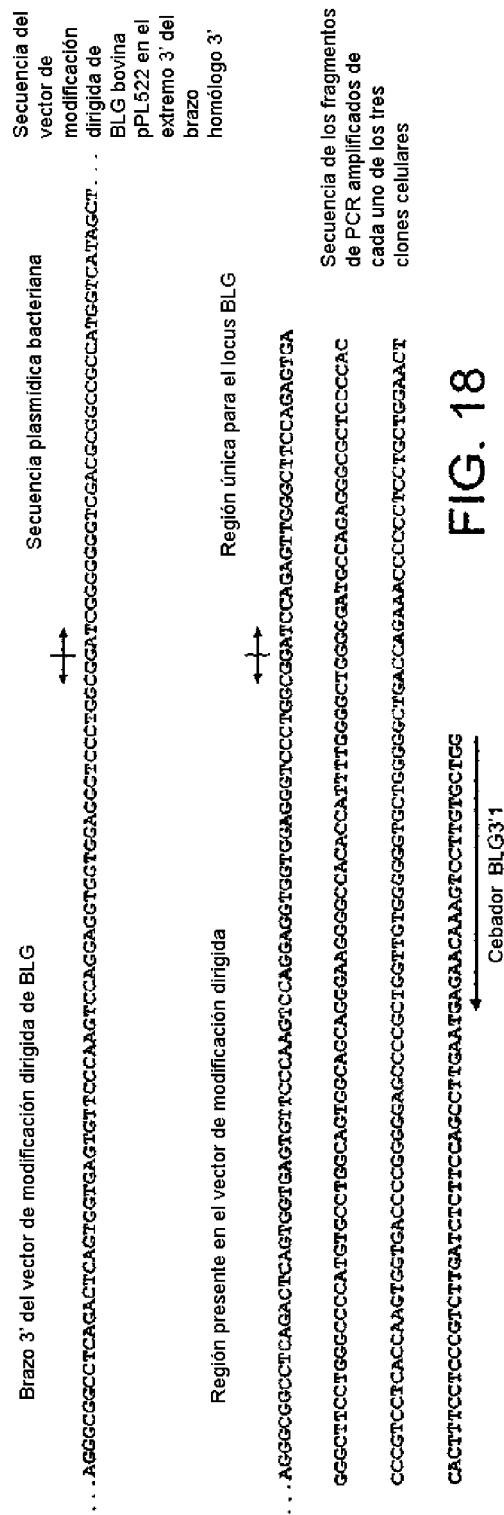


FIG. 18

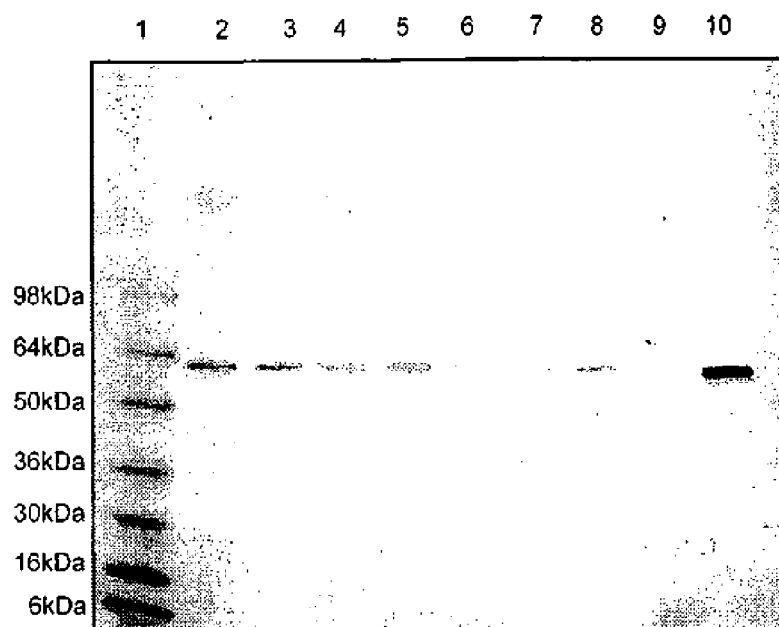


FIG. 19

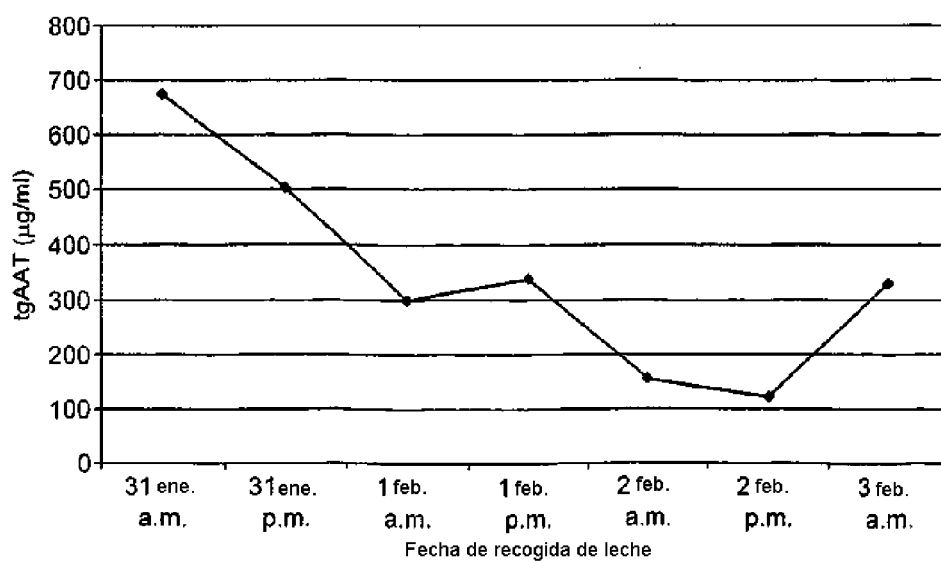
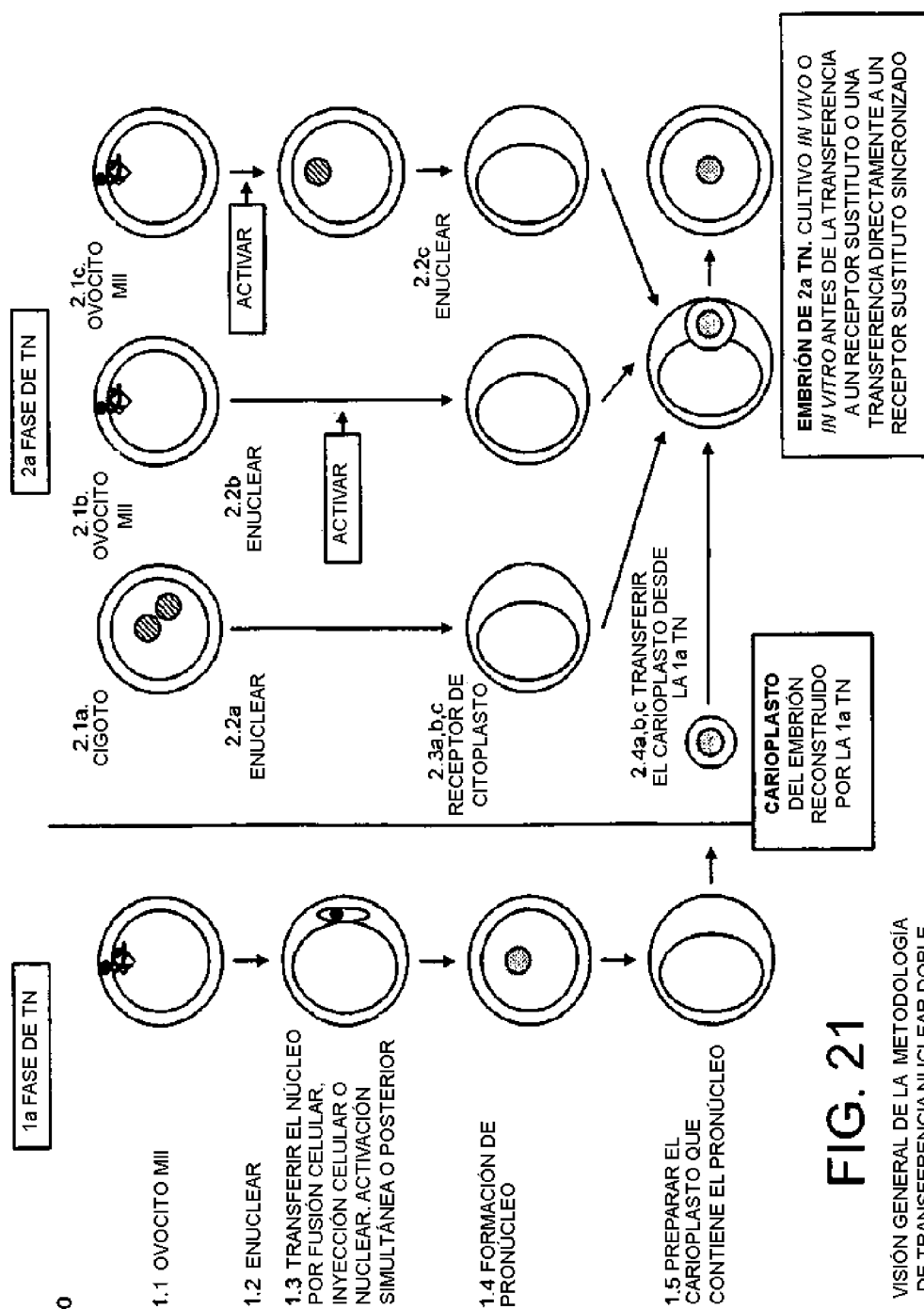


FIG. 20



**FIG. 21**

VISIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRANSFERENCIA NUCLEAR DOBLE