

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
29 de Enero de 2009 (29.01.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2009/014410 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C12N 15/00 (2006.01) A01K 67/00 (2006.01)  
C12N 5/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/MX2007/000085

(22) Fecha de presentación internacional:  
23 de Julio de 2007 (23.07.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante e

(72) Inventor: ROA VIDAL, Juan Jesús [MX/MX]; Federalistas 1029-4, Real del Bosque, Zapopan, Jalisco 45130 (MX).

(74) Mandatario: GARCÍA VILLA, Porfirio; A las Sierras 121, Prados Vallarta, Zapopan, Jalisco 45020 (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW,

BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaración según la Regla 4.17:

— sobre divulgaciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad (Regla 4.17(v))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional



WO 2009/014410 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CLONED BOVINE EMBRYOS

(54) Título: MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES CLONADOS DE BOVINO

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing cloned bovine embryos, avoiding the use of mutagenic electromagnetic frequencies and chemical agents, commonly used for the production of cloned embryos and strongly impacting the viability of the development of the embryo. In this way, this novel alternative enables better viability and provides a future for the development of these organisms without alterations that may endanger the genomic stability of the organism.

(57) Resumen: Un método para producir embriones clonados de bovino mediante el cual se evita el uso de frecuencias electromagnéticas mutagénicas y agentes químicos comúnmente utilizados para la productividad de embriones clonados, y que ha impactado fuertemente la viabilidad del desarrollo embrionario. Así, esta nueva alternativa permite obtener una mejor viabilidad y proveer a futuro el desarrollo de estos organismos sin la intervención de alteraciones que puedan poner en riesgo la estabilidad genómica del organismo.

# METODO PARA LA PRODUCCION DE EMBRIONES CLONADOS DE BOVINO

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

### **Campo de la Invención.**

La invención se relaciona con procedimientos para la clonación de embriones y mas específicamente con un método para producir embriones clonados de bovinos.

10

### **Arte Previo relacionado.**

Bovinos adultos han sido clonados usando células del cúmulo (Kato et al., 1998. Kato et al., 2000, Tani et al., 2001), fibroblastos (Kato et al., 2000, Zakhartchenko et al., 1999, Hill et al., 2000, Kishi et al., 2000 Kubota et al., 2000, Kasinathan et al., 2002 Heyman et al., 2001), granulosa (Gibbons et al., 2002, Wells et al., 1999, Wells et al., 1998, Edwards et al., 2001 Piedrahita et al., 2002), glándula mamaria (Zakhartchenko et al., 1999, Kishi et al., 2000) de músculo (Shiga et al., 1999). células del oviducto (Kato et al., 2000, Goto et al., 1999) uterinas (Kato et al., 2000) y células Sertoli (Wakayama et al., 1998).

20

Después de la colección, las células somáticas pueden ser utilizadas inmediatamente (Wakayama et al., 1998) o después de cultivarse por largo plazo (Kubota et al., 2000)

25

El uso del tipo de células adultas en estado de quiescencia inducida o no (Wilmut et al., 1997) o sin quiescencia (Edwards et al., 2001, Shiga et al., 1999, Wakayama y Yanagimachi 1999,

Edwards et al., 2000) es requerido para producir crías clonadas de animales adultos.

Para la obtención de embriones clonados, los ovocitos generalmente provienen de un grupo no descrito de hembras  
5 obtenidas de fuentes comerciales, los rastros (Prather et al., 1987, Hill et al., 2000, Kishi et al., 2000, Kubota et al., 2000, Herman et al., 2002, Wells et al., 1999, Wells et al., 1998, Edwards et al., 2001, Piedrahita et al., 2002) o un grupo descrito de animales vivos usando aspiración por ultrasonido-guiado) (Bruggerhoff et al., 2002).

10 El próximo paso es insertar un núcleo somático en el citoplasto del ovocito, para restaurar la equivalencia de una célula embrionaria. En especies domésticas, esto se realiza por la fusión de la inducción eléctrica de la célula somática con el citoplasto (Wilmut et al., 1997, Gibbons et al., 2002, Hill et al., 2000, Kishi et al.,  
15 al., 2000, Kubota et al., 2000, Herman et al., 2002, Wells et al., 1999, Wells et al., 1998, Edwards et al., 2001, Piedrahita et al., 2002)

Inicialmente, una célula somática se inserta mecánicamente en el espacio perivitelino, después de esto el acoplamiento resultante (el citoplasma del ovocito y la célula somática) es  
20 alineado entre dos electrodos y con un pulso de corriente eléctrica, (por ejemplo, de 2.2 kV/cm<sup>2</sup> durante 40  $\mu$ s inducirán > 70% de acoplamientos fundidos. (Edwards et al., 1999).

La electrofusión depende de mantener el contacto de la célula somática con el citoplasma del ovocito de manera tal que las  
25 membranas de cada citoplasma se entremezclan después de la formación del poro que se produce posterior a la corriente eléctrica (First y Prather, 1991).

Se han usado varias combinaciones químicas para la activación (Gibbons et al., 2002 Susko-Parrish et al., 1994), a pesar de los métodos de elección, la activación imita las acciones de una esperma después de la fertilización.

- 5 Pueden transferirse los embriones clonados en oviductos ligados de hembras nodrizas (Wilmut et al., 1997) o cultivarse en la incubadora durante en período de tiempo requerido para el desarrollo a mórula compacta o blastocisto y transferirse a las hembras receptoras previas sincronización (Edwards et al., 2001).
- 10 Cada paso de la técnica tiene un grado de eficiencia por lo que la suma de los % de fallas dan un resultado ultimo en el % de viabilidad del clon.

Para el desarrollo de organismos clónicos las siguientes tres técnicas son de suma importancia:

- 15 A- Reprogramación de células somáticas  
B- Maduración y enucleación de ovocito.  
C- Activación del citoplasto reconstruido.

### **SUMARIO DE LA INVENCION**

20

Un propósito de la presente invención es proponer un nuevo método para la producción de embriones clonados de bovino mediante el cual se evita la utilización de agentes dañinos que desequilibran el medio osmótico del óvulo maduro Hoestch.

25

Otro objetivo de la invención es proporcionar un nuevo método para la producción de embriones clonados en el que se evita la utilización del transiluminador de luz ultravioleta que produce mutaciones (fracturas del DNA) en el genoma.

Un objetivo más de la presente invención es que se evita la lisis del DNA por el proceso de enucleación ya que el plato metafísico no tiende a disgregarse con el uso de la sacarosa (agente deshidratante) en comparación al sistema tradicional.

5 Un objetivo adicional de la invención es que con el nuevo método de clonación de embriones de bovino se obtiene el acortamiento de tiempos de exposición y concentraciones altas de citoquelacina B (relajante para microtúbulos) ya que la concentración del plato metafísico ayuda a zonificar la zona de  
10 enucleación.

Es otro objetivo adicional del nuevo método es proveer la doble activación con electricidad y etanol lo que hace una doble curva de ascenso de ión calcio por un periodo más prolongado.

15

### **DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION**

La reprogramación nuclear de células somáticas en ovocitos  
20 enucleados de bovino ha sido, desde su primer trabajo presentado a la comunidad científica, una herramienta importante para el desarrollo de células, tejidos y organismos reprogramados para su uso en la industria nutricional, farmacéutica, la del genotransplante, así como la producción de animales transgénicos  
25 y organismos genéticamente superiores en la industria animal.

El uso de frecuencias electromagnéticas mutagénicas, así como agentes químicos para la productividad de embriones clonados ha impactado fuertemente la viabilidad del desarrollo embrionario por lo que el establecer alternativas para evitar el uso  
5 de estos agentes ha permitido obtener una mejor viabilidad y proveer a futuro el desarrollo de estos organismos sin la intervención de alteraciones que pueda poner en riesgo la estabilidad genómica del organismo.

Como un paquete tecnológico que tiene un alto valor en el  
10 mercado biotecnológico por su gran aplicación y penetración en las diferentes industrias antes mencionadas, las mejoras a las diferentes secciones técnicas son relevantes puesto que cada 1% de viabilidad puede representar de varios miles o cientos de dólares como es el caso de un animal transgénico, que su precio en el  
15 mercado oscila alrededor del millón de dólares.

Derivado de lo anterior, mediante la presente invención se propone un nuevo método para la producción de embriones clonados que se caracteriza por las siguientes etapas:

20 1.- Colección del feto en el rastro: Se mueve el útero del animal, se limpia con alcohol, se extrae la placenta y se lava con PBS y antibiótico (penicilina 100 UI/ml). El feto con su saco amniótico, se deposita en un frasco estéril con nuevo medio PBS y antibiótico a 4°C para ser transportado al laboratorio.

25

2.- Preparación del feto: Se transfiere el feto a una caja petri de 10 cm de diámetro. Con tijeras estériles y unas pinzas, se abre el saco amniótico y se cambia el feto a otra caja petri que contiene

PBS. El líquido amniótico se remueve con una jeringa. Se secciona la cola y la cabeza para congelarlas en PBS con 10% de glicerol para futuros análisis moleculares.

5           3.- Disgregación celular: Las piezas de tejido diseccionadas, se cortarán en pequeños trozos con ayuda de un bisturí y pinzas, los trozos se pasan a una caja petri que contiene 4 ml de solución tripsina al 0.25% y 1mM de EDTA en PBS. Este tejido colectado y cortado, se succiona dentro y fuera de una pipeta Pasteur. Se pone  
10 a incubar 15 minutos a 38°C agitando la suspensión y pipeteando para facilitar la disgregación.

          4.- Sembrado y cultivo celular: Para el cultivo, previamente se precalienta el medio MEM (sigma) con suero fetal bovino al 15% y  
15 antibiótico (Amikacina 150 µg/ml y penicilina 100 µg/ml). Para inactivar la tripsina, la suspensión se centrifuga y se retira el sobrenadante. El pellet se resuspende en medio de cultivo (MEM) y se centrifuga una vez más a 5 min. a 700 rpm. Se resuspende el pellet en 2 ml de medio de cultivo, esta suspensión se filtra por  
20 medio de tres capas de gasa estéril, el filtrado se centrifuga, se resuspende en 2 ml de medio y se siembra en una caja de petri de 10 cm y se pone a incubar a 38.5°C con 90% de humedad relativa en 5% de CO<sub>2</sub> y aire filtrado. Los cultivos se examinan después de 24 horas. Para estas células, el número de pasajes son de 4 por lo  
25 que su duración en cultivo es alrededor del día 20.

## **A) OBTENCION Y MADURACION DE OVOCITOS IN VITRO DE BOVINO**

Los ovarios son colectados en el rastro directamente del aparato reproductivo, los ovarios se seccionaron y se transportaron al laboratorio en la solución salina fisiológica con penicilina a una concentración de 100,000 UI por litro, se enjuagan y se seleccionan los ovarios para su aspiración, descartando aquellos ovarios que se encuentran en anestro.

Obtención de ovocitos: los folículos de 3 a 7 mm de diámetro son aspirados utilizando una jeringa de 10 cm., con una aguja de calibre 19 G. El líquido folicular recuperado se vacía a un tubo cónico de plástico de 50 ml, donde se deja sedimentar a baño maría a 38°C durante 15 minutos. Se deposita el líquido folicular en cajas petri de 10 cm., donde son colectados el complejo cúmulo ovocito (CCO) de mejor calidad de acuerdo a su clasificación morfológica. Una vez colectados, los CCO son puestos en gotas de medio de cultivo 199 (TCM-199) suplementando con 20 mM de HEPES, 0.4% de suero albúmina bovina, 0.2 mM de piruvato de sodio y 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina. Los CCO se lavan y posteriormente son transferidos al medio de maduración que consiste del medio TCM-199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.2 mM de piruvato de sodio, 35 ug/ml de FSH (Foltropin) y penicilina estreptomicina a la concentración anterior. Las cajas se transfieren a la estufa a una temperatura de 39°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y una saturación de humedad superior al 90% durante 20 horas.

25

## **B) ENUCLEACION Y RECONSTRUCCION NUCLEAR**

Inicialmente se preparan todos los medios necesarios para desnudar, manipular, fusionar, activar y cultivar. Se precalienta una



alícuota de hialuronidasa a 39°C una hora antes de desnudar. Se prepara aproximadamente 25 ml de medio de manipulación a partir del stock de medio TCM más hepes adicionándole 50 µg/ml de gentamicina y 5% de suero fetal bovino (SFB) y se mantiene a 37°C  
5 en la incubadora sin CO<sub>2</sub>. A partir de este medio de manipulación se prepara 10 ml para la micromanipulación adicionando 75 µl para una concentración de trabajo de 7.5 µg/ml. Después de 18 horas de maduración los ovocitos son desnudados con hialuronidasa en TCM-199 hepes durante 5 minutos en vortex, posteriormente se  
10 lavan en medio de manipulación. Se seleccionan los ovocitos con cuerpo polar, citoplasma oscuro y homogéneo para clonación. Antes de la micromanipulación los ovocitos son incubados en medio PBS adicionando 7.5 µg/ml de citoquelacina B y 0.3% de sucrosa durante 10 minutos. Se descongeló en vial celular a 37°C.

15 Previamente se calentó DMEM con 5% de suero fetal bovino, se centrifuga a 800 rpm por 15 minutos en el mismo medio. Se descarta el sobrenadante y se resuspende 10 veces en 5 ml de DMEM con 5-10% de SFB. Se procede a enuclear los ovocitos los cuales se pasaron a las placas, en el micromanipulador los platos  
20 cromosómicos son removidos usando pipeta de vidrio de 20 micras de diámetro interno, el plato metafísico con un mínimo volumen de citoplasma es removido al eyectar una protución en el espacio perivitelino, inmediatamente después, se reconstruye el citoplasto con la célula de fibroblasto y se procede a la organización de la  
25 polaridad del citoplasto- fibroplasto.

**C) ACTIVACION**

Se prepara la cicloheximida para la activación, 10 µl del stock de cicloheximida en 1 ml de TCM Hepes para una concentración de trabajo de 10 pg/ml. El etanol se utiliza al 7% en medio TCM Hepes, 5 minutos en medio de manipulación, se lava con medio de manipulación varias veces, y después en TCM Hepes, 5 horas en cicloheximida (10pg/ml) en TCM Hepes, se incuba los pre-embryones en atmósfera 5% de CO<sub>2</sub> a 39°C.

**10 D) DESARROLLO DE EMBRIONES CLONICOS IN VITRO**

48 horas post-incubación se sacan los óvulos degenerados y sin fragmentación, los pre-embryones con segmentación se lavan 3 veces en TCM Hepes y se pasan a SOF aa, se incuba durante 5 días en la incubadora a 38.5°C con una humedad relativa del 90% y una mezcla de gases compuesta por 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de Nitrógeno. Los embryones se evalúan a los días 5 y 7 a partir de su activación.

Aunque esta invención ha sido descrita en el contexto de su modalidad preferida, para los especialistas en la materia será evidente que el alcance de la presente invención se extiende más allá de la modalidad específicamente descrita a otras modalidades alternas y/o usos de la invención que sean obvias y derivables de la misma. Además, aunque la invención se ha mostrado y descrito en detalle con apego a un modo de realización ejemplificativa, algunas otras modificaciones o cambios serán claramente evidentes para especialistas en este campo, en particular tomando como base la descripción que antecede. Por consiguiente, se estima que pueden

hacerse varias combinaciones de las características específicas y aspectos de la metodología aquí descrita que caerían indiscutiblemente dentro del alcance de la protección del método reivindicado.

- 5 Habida cuenta de lo anterior, se pretende que el alcance de la invención no deberá estar limitado por las modalidades particularmente ejemplificadas, sino que dicho alcance deberá estar definido por una lectura razonable de las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir embriones clonados de bovino, que se caracteriza por las etapas de:

- 5 a) obtención y maduración de ovocitos in vitro de bovino a través del siguiente procedimiento:

10 los ovarios son colectados en el rastro directamente del aparato reproductivo, los ovarios se seccionaron y se transportaron al laboratorio en la solución salina fisiológica con penicilina a una concentración de 100,000 UI por litro, se enjuagan y se seleccionan los ovarios para su aspiración, descartando aquellos ovarios que se encuentran en anestro;

15 obtención de ovocitos: los folículos de 3 a 7 mm de diámetro son aspirados utilizando una jeringa de 10 cm., con una aguja de calibre 19 G; el líquido folicular recuperado se vacía a un tubo cónico de plástico de 50 ml, donde se deja sedimentar a baño maría a 38°C durante 15 minutos; se deposita el líquido folicular en cajas petri de 10 cm., donde son colectados el complejo cúmulos ovocito (CCO) de mejor  
20 calidad de acuerdo a su clasificación morfológica; una vez colectados, los CCO son puestos en gotas de medio de cultivo 199 (TCM-199) suplementando con 20 mM de HEPES, 0.4% de suero albúmina bovina, 0.2 mM de piruvato de sodio y 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina; los  
25 CCO se lavan y posteriormente son transferidos al medio de maduración que consiste del medio TCM-199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.2 mM de piruvato de sodio, 35 ug/ml de FSH (Foltropin) y penicilina estreptomina a la

concentración anterior; las cajas se transfieren a la estufa a una temperatura de 39°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y una saturación de humedad superior al 90% durante 20 horas;

- 5 **b)** enucleación y reconstrucción nuclear mediante el siguiente procedimiento:

Inicialmente se preparan todos los medios necesarios para desnudar, manipular, fusionar, activar y cultivar. Se precalienta una alícuota de hialuronidasa a 39°C una hora  
10 antes de desnudar; se prepara aproximadamente 25 ml de medio de manipulación a partir del stock de medio TCM más hepes adicionándole 50 µg/ml de gentamicina y 5% de suero fetal bovino (SFB) y se mantiene a 37°C en la incubadora sin CO<sub>2</sub>; a partir de este medio de manipulación se prepara 10 ml  
15 para la micromanipulación adicionando 75 µl para una concentración de trabajo de 7.5 µg/ml; después de 18 horas de maduración los ovocitos son desnudados con hialuronidasa en TCM-199 hepes durante 5 minutos en vortex, posteriormente se lavan en medio de manipulación;  
20 se seleccionan los ovocitos con cuerpo polar, citoplasma oscuro y homogéneo para clonación; antes de la micromanipulación los ovocitos son incubados en medio PBS adicionando 7.5 µg/ml de citoquelacina B y 0.3% de sucrosa durante 10 minutos; se descongeló en vial celular a 37°C;

25 previamente se calentó DMEM con 5% de suero fetal bovino, se centrifuga a 800 rpm por 15 minutos en el mismo medio; se descarta el sobrenadante y se resuspende 10 veces en 5 ml de DMEM con 5-10% de SFB; se procede a

enuclear los ovocitos los cuales se pasaron a las placas, en el micromanipulador los platos cromosómicos son removidos usando pipeta de vidrio de 20 micras de diámetro interno, el plato metafísico con un mínimo volumen de citoplasma es  
5 removido al eyectar una protución en el espacio perivitelino, inmediatamente después, se reconstruye el citoplasto con la célula de fibroblasto y se procede a la organización de la polaridad del citoplasto-fibroplasto;

**c) activación conforme al siguiente proceso:**

10 se prepara la cicloheximida para la activación, 10 µl del stock de cicloheximida en 1 ml de TCM Hepes para una concentración de trabajo de 10 pg/ml; el etanol se utiliza al 7% en medio TCM Hepes, 5 minutos en medio de manipulación, se lava con medio de manipulación varias  
15 veces, y después en TCM Hepes, 5 horas en cicloheximida (10pg/ml) en TCM Hepes, se incuba los pre-embriones en atmósfera 5% de CO<sub>2</sub> a 39°C; y

**d) desarrollo de embriones clónicos in Vitro según el siguiente proceso:**

20 48 horas post-incubación se sacan los óvulos degenerados y sin fragmentación, los pre-embriones con segmentación se lavan 3 veces en TCM Hepes y se pasan a SOF aa, se incuba durante 5 días en la incubadora a 38.5°C con una humedad relativa del 90% y una mezcla de gases  
25 compuesta por 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de Nitrógen; los embriones se evalúan a los días 5 y 7 a partir de su activación.

2. El método de la reivindicación 1, que se caracteriza en que no se utilizan agentes dañinos que desequilibren el medio osmótico del óvulo maduro Hoestch.
- 5 3. El método de la reivindicación 1, que se caracteriza en que no se utiliza transiluminador de luz ultravioleta para evitar producir mutaciones (fracturas del DNA) en el genoma.
4. El método de la reivindicación 1, que se caracteriza en que se evita la lisis del DNA por el proceso de enucleación ya que el plato metafísico no tiende a disgregarse con el uso de la sacarosa (agente deshidratante) en comparación al sistema tradicional.
- 10 5. El método de la reivindicación 1, que se caracteriza por el acortamiento de tiempos de exposición y concentraciones altas de citoquelacina B (relajante para microtúbulos) ya que la concentración del plato metafísico ayuda a zonificar la zona de enucleación.
- 15 6. El método de la reivindicación 1, que se caracteriza por la doble activación con electricidad y etanol lo que hace una doble curva de ascenso de ión calcio por un periodo más prolongado.
- 20 7. Embriones clonados obtenidos conforme al método que se descrito en las reivindicaciones anteriores.
- 25

**Recuadro N° VIII.v) DECLARACIÓN: DIVULGACIONES NO PERJUDICIALES O EXCEPCIONES A LA FALTA DE NOVEDAD**

*La declaración debe ajustarse a la redacción homologada prevista en la Instrucción 215; ver las notas relativas a los Recuadros N°s VIII, VIII.i) a v) (generalidades) y las notas específicas al Recuadro N° VIII.v). Si no se utiliza este recuadro, esta hoja no se debe incluir en el petitorio.*

Declaración sobre las divulgaciones no perjudiciales o las excepciones a la falta de novedad (Reglas 4.17.v) y 51bis.1.a)v):

Respecto de esta solicitud internacional, Juan Jesús Roa Vidal declara que el objeto reivindicado en la presente solicitud se divulgó como sigue:

- i) Tipo de divulgación: Exposición de Innovaciones local
- ii) Fecha de la divulgación: 24 y 25 de Julio de 2006.
- iii) Lugar de la divulgación: Guadalajara, Jalisco. México

Esta declaración continúa en la hoja siguiente, "Continuación del Recuadro N° VIII.v)".



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ MX 2007/000085

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US5453366 (SIMS MM & ROSENKRANS CF, Jr) 26.09.1995, column 4, lines 5-40; column 7, lines 18-67; column 8, lines 1-67; column 9, lines 1-19.	1, 4, 7
X	US62415041 (STICE SL, CIBELLI J, ROBL JM, GOLUEKE P & JERRY DJ) 10.04.2001, column 10, lines 48-67; column 11, lines 19-67; column 13, lines 30-56; column 20, lines 1-35.	1, 4, 7
X	BRÜGGERHOFF K. et al. Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Using Recipient Oocytes Recovered by Ovum Pick-Up: Effect of Maternal lineage of Oocyte Donors. Biology of Reproduction. 2002, Vol 66, pages 367-373, page 367, column 2; page 368, column 2, paragraph 2.	1, 4, 6-7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 2008 (11.04.2008)

Date of mailing of the international search report

(18/04/2008)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M<sup>a</sup> D. García Grávalos

Telephone No. +34 913493404

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **2, 3, 5**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**Claims 2-3 and 5 do not clearly define the subject matter for which protection is sought. The technical features are not indicated clearly and it is therefore not possible to examine these claims with regard to novelty and inventive step.**
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ MX 2007/000085

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5453366 A	26.09.1995	CA 2043088 A CA 2043065 A GB 2246366 AB US 5096822 A	27.01.1992 27.01.1992 29.01.1992 17.03.1992
US 6215041 B1	10.04.2001	WO 9934669 A1 AU 2211499 A EP 1045635 A1 AU 2003204387 A1	15.07.1999 26.07.1999 25.10.2000

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 15/00* (2006.01)

*C12N 5/00* (2006.01)

*A01K 67/00* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ MX 2007/000085

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US5453366 (SIMS MM & ROSENKRANS CF, Jr) 26.09.1995, columna 4, líneas 5-40; columna 7, líneas 18-67; columna 8, líneas 1-67; columna 9, líneas 1-19.	1, 4, 7
X	US62415041 (STICE SL, CIBELLI J, ROBL JM, GOLUEKE P & JERRY DJ) 10.04.2001, columna 10, líneas 48-67; columna 11, líneas 19-67; columna 13, líneas 30-56; columna 20, líneas 1-35.	1, 4, 7
X	BRÜGGERHOFF K. et al. Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Using Recipient Oocytes Recovered by Ovum Pick-Up: Effect of Maternal Lineage of Oocyte Donors. Biology of Reproduction. 2002, Vol 66, páginas 367-373, página 367, columna 2; página 368, columna 2, párrafo 2.	1, 4, 6-7

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 11 Abril 2008 (11.04.2008)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 18 de Abril de 2008 (18/04/2008)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado M <sup>a</sup> D. García Grávalos Nº de teléfono +34 913493404

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ MX 2007/000085

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones n°s: 2-3, 5  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:  
**Las reivindicaciones 2-3 y 5 no definen claramente el objeto cuya protección se pretende. Las características técnicas no están indicadas claramente y no es posible por lo tanto examinar estas reivindicaciones con respecto a su novedad y actividad inventiva.**
  
3.  Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
  
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
  
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
  
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.

El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/MX 2007/000085

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 5453366 A	26.09.1995	CA 2043088 A CA 2043065 A GB 2246366 AB US 5096822 A	27.01.1992 27.01.1992 29.01.1992 17.03.1992
US 6215041 B1	10.04.2001	WO 9934669 A1 AU 2211499 A EP 1045635 A1 AU 2003204387 A1	15.07.1999 26.07.1999 25.10.2000

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

*C12N 15/00* (2006.01)

*C12N 5/00* (2006.01)

*A01K 67/00* (2006.01)