



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 25 156 T2** 2007.09.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 268 836 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 25 156.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/07018**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 918 350.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/073094**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.03.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.10.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.09.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/87** (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

537861 28.03.2000 US

(73) Patentinhaber:

Bioagri Corp., City of Industry, Calif., US

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**WANG, Kangsheng, Rowland Heights, CA 91748,
US**

(54) Bezeichnung: **NICHT-MENSCHLICHE SPERM-DNS ZUBEREITUNGEN ZUR GENETISCHEN VERÄNDERUNG
NICHT-MENSCHLICHER TIERE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der genetischen Modifikation von nicht-menschlichen Tieren.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die wirksame genetische Modifizierung von Tieren, insbesondere höheren Säugetieren, war in den letzten beiden Dekaden ein Hauptziel für Forscher auf dem Gebiet der Biotechnologie. Die genetische Modifikation von Tieren kann nicht nur unser Verständnis von Genen und Genfunktionen in vielzelligen Organismen verbessern, sondern kann ebenfalls in der Bioindustrie und der landwirtschaftlichen Industrie nutzbringend angewandt werden. Beispiele dieser Einsatzmöglichkeiten schließen die Aufzucht von Vieh mit gewünschten Eigenschaften, wie zum Beispiel schnellerer Wachstumsrate, Produktion von therapeutischen Proteinen in der Milch oder sogar die Erzeugung von stärker „humanisierten“ Tierorganen für die Verwendung bei der Xenotransplantation von einem Tier auf einen Menschen ein.

[0003] Die gegenwärtigen Techniken, um das Genom zu modifizieren, schließen die Mikroinjektion von Fremd-DNA in den Vorkern von befruchteten Eizellen und die Zuführung von Fremd-DNA über lipid-basierte Agenzien, Elektroporation oder virale Infektion in embryonische Stammzellen in vitro oder blastomere Zellen in vivo ein. Für die gegenwärtigen Techniken wurde jedoch berichtet, dass sie, abgesehen von Mäusen, in höheren oder größeren Tieren nur begrenzten Erfolg haben. Es wurde zum Beispiel berichtet, dass die Mikroinjektionstechnik technisch sehr anspruchsvoll ist und die Verwendung von hoch empfindlichen und teuren Geräten erfordert. Es wurde ebenfalls berichtet, dass die Lebensfähigkeit von Embryos nach der Mikroinjektion sehr schlecht ist. Wall, R.J., et al. (1992) Making Transgenic Livestock, Genetic Engineering on a Large Scale, Journal of Cellular Biochemistry, Band 49, Seiten 113-120. Das hat dazu geführt, dass Forscher auf dem Gebiet alternative und einfachere Wege untersucht haben, um Gene in ein Tier einzubringen.

[0004] 1989 berichteten Lavitrano, M., et al., dass die einfache Inkubation von Fremd-DNA mit Mausspermienzellen und die in vitro Durchführung der Befruchtung zu genetisch modifizierten Mäusen führen konnte. Lavitrano, M., et al. (1989) Sperm Cells as Vectors for Introducing Foreign DNA into Eggs – Genetic Transformation of Mice, Cell. Band 57, Seiten 717-723. Als das Äquivalent zu einer "kalte Fusion" in der Biotechnologie bezeichnet, erzeugte dieser Bericht viel Aufregung auf dem Gebiet. Birnstiel, M., et. al. (1989) Dangerous Liaisons: Spermatozoa as Natural Vectors for Foreign DNA?, Cell. Band 57, Seiten 701-702. Es wird jedoch berichtet, dass die Fachleute bis zum heutigen Tag gegenüber Lavitranos Bericht skeptisch bleiben, da eine Reihe von Forschern auf dem Gebiet nachgewiesenerweise dabei versagt haben, das Experiment zu wiederholen. Brinster, R., et. al. (1989) No Simple Solution for Making Transgenic Mice, Cell, Band 59, Seiten 239-241; Smith, K. (1999) Sperm Cell Mediated Transgenesis: A Review, Animal Biotechnology, Band 10(1&2), Seiten 1-13.

[0005] Über die letzte Dekade haben sich die Bemühungen fortgesetzt, die Verwendung von Spermienzellen als Vektor zur Vermittlung des Gentransfers in Tieren zu erforschen. Forscher haben herausgefunden, dass Spermienzellen die inhärente Fähigkeit besitzen, Fremd-DNA zu internalisieren. Francolini, M., et. al. (1993) Evidence for Nuclear Internalization of Exogenous DNA into Mammalian Sperm Cells, Mol. Reprod. Devel., Band 34, Seiten 133-139. Bestimmte inhibitorische Faktoren, die in der Samenflüssigkeit vorliegen, können jedoch diese Fähigkeit, DNA aufzunehmen, hemmen. Lavitrano, M., et. al. (1992) The Interaction Between Exogenous DNA and Sperm Cells, Mol. Reprod. Devel., Band 31, Seiten 161-169. Zusätzlich kann Fremd-DNA, die in Spermienzellen eingeführt wird, ebenfalls unter der umfassenden Neuordnung der DNA leiden, da in reifen Spermienzellen die Internalisierung von Fremd-DNA in diesen Zellen bestimmte endogene Nukleasen aktivieren kann. Maione, B. et. al. (1997) Activation of Endogenous Nucleases in Mature Sperm Cells upon Interaction with Exogenous DNA, DNA and Cell Biology, Band 16, Seiten 1087-1097. Eine solche Neuordnung kann die Nützlichkeit von genetisch modifizierten Tieren, die unter Verwendung dieser Technik erzeugt wurden, gefährden.

[0006] Gandolfi F. berichtet in „Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals“, Transgenic Research 1, 147-155 (1998), dass die Interaktion von Spermatozoen und exogenen DNA-Molekülen als eine verlässliche experimentelle Beobachtung angenommen werden kann. Gemäß Gandolfi F. begegnet man jedoch, nachdem die DNA in die Eizelle gelangt ist, bei einem einfachen Austausch von Genen zum Zeitpunkt der Befruchtung größeren Hindernissen, da in den meisten Fällen die exogenen Gene komplett oder teilweise abgebaut

und/oder neu angeordnet wurden.

[0007] EP 0 867 114 A1 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von transgenen, nicht-menschlichen Wirbeltieren, in dem eine exogene DNA in den Hoden eines erwachsenen, nicht-menschlichen Männchens eines Wirbeltier injiziert wird, nachdem sie für die Überführung von DNA in Säugetierzellen einen Komplex mit einem Liposom gebildet hat.

[0008] US 5,428,132 beschreibt ein DNA-Antikörperkonjugat und ein Verfahren zur Integration von Fremd-DNA in Zellen in einer gewebsspezifischen Art und Weise durch Konjugation der Fremd-DNA mit einem zielspezifischen Antikörper.

[0009] Schließlich berichten Smith et al., „Sperm cell mediated transgenesis: A review“, Animal Biotechnology, 10 (1 & 2), 1-13 (1999) über bestehende Technologien, die Spermienzellen als transgene Vektoren verwenden, und zwischen 1989 und 1999 veröffentlicht wurden.

[0010] Andere Arbeiten mit Spermienzellen als Vektoren haben sich für die Zuführung von Fremd-DNA in die Spermienzellen auf die Verwendung von entweder lipid-basierten Mitteln oder Elektroporation konzentriert. Smith, supra; Rottman R., et al. (1996) Liposome-mediated Gene Transfer via Sperm Cells. High Transfer Efficiency and Persistence of Transgenes by Use of Liposomes and Sperm Cells and a Murine Amplification Element. Journal of Animal Breeding and Genetics, Band 113, Seiten 401-411; PCT Veröffentlichungen WO 99/42569, WO 99/40213, und WO 97/11597. Solche Verfahren können ebenfalls unter demselben Problem der DNA-Internalisierung und der Exposition gegenüber Nukleasen, die die Umstrukturierung der Fremd-DNA, die eingeführt wird, verursachen können, leiden. Zusätzlich können lipid-basierte Mittel, die oftmals toxisch sind, und die Elektroporation umfangreiche Experimente erfordern, um das Absterben oder den Verlust der Beweglichkeit der Spermienzellen zu verhindern. Andere Techniken haben sich auf die Verwendung einer Infektion mit rekombinanten Viren, wie in PCT-Veröffentlichung WO 99/38991 offenbart, oder auf die Verwendung einer „gene gun“ mit Mikroträgern, wie in PCT-Veröffentlichung WO 93/24626 offenbart, konzentriert, um Fremd-DNA in Spermienzellen einzuführen. Solche Techniken können technisch anspruchsvoll sein und ebenfalls die Lebensfähigkeit und Beweglichkeit der Spermienzellen beeinflussen. Sie können ebenfalls unter demselben Problem der DNA-Internalisierung und der Aussetzung gegenüber Nukleasen, die die Umstrukturierung der Fremd-DNA, die eingeführt wird, verursachen können, leiden.

[0011] Seit 1989 haben Forscher von der Verwendung von Spermienzellen als Vektoren in verschiedenen Tieren, die sich von Insekten bis zu Meereslebewesen, Amphibien, Vögeln und Säugetieren erstrecken, berichtet. Smith, supra. Wenige berichteten jedoch, dass die genetische Modifikation in lebensfähigem, voll entwickeltem Nachwuchs beobachtet wurde. Smith, supra. Problematischer ist die Tatsache, dass einige Berichte nur die PCR-Analyse verwendeten, um die Existenz der Fremd-DNA in den Zellen zu bestätigen. Diese Berichte sind in Tabelle eins in Gandolfi, F. (1998) Spermatozoa, DNA Binding and Transgenic Animals, Transgenic Research, Band 7, Seiten 147-155, zusammengefasst. Da die PCR nicht zwischen Fremd-DNA die durch Episome oder die durch chromosomale DNA übertragen wurde unterscheiden kann, hat Gandolfi den Wert dieser Berichte in Frage gestellt, und festgestellt, dass „das eine wichtige Diskussion eröffnet, die sich auf die angemessene Bewertung der Ergebnisse, die in manchen Berichten beschrieben werden, bezieht“. Gandolfi, supra. Die episomale Transmission ist nicht so wünschenswert wie die chromosomale Transmission, da das Episom während der folgenden Zellteilung verloren gehen und die gewünschte Wirkung der genetischen Modifikation in erwachsenen Tieren niemals hergestellt werden kann.

[0012] Da eine einfache, nicht-toxische und wirksame Art und Weise Tiere, insbesondere höhere Säugetiere, genetisch zu modifizieren dieses Gebiet weit voranbringen kann, wird eine neue Art der Verwendung von Spermienzellen zur Einbringung von Genen in Tiere benötigt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung richtet sich auf einen Vektor, der verwendet wird, um genetisch modifizierte, nicht-menschliche Tiere und Zellen zu erzeugen. Ein Aspekt dieser Erfindung schließt einen Vektor, der eine Spermienzelle und ein oder mehrere Polynukleotidmoleküle, die durch einen oder mehrere nicht liposom-basierte Linker an eine Spermienzelle gebunden sind, ein. Die Spermienzelle ist eine nicht-menschliche tierische Spermienzelle. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung kodieren das eine oder die mehreren Polynukleotidmolekül(e) für ein Genprodukt, das den Zellen oder den Tieren die gewünschten Eigenschaften verleiht. Der Linker der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper, der an die äußere Oberfläche der Spermienzelle bindet. Der Linker interagiert vorzugsweise über ionische Wechselwirkung mit einem oder mehreren Po-

lynukleotidmolekülen. Diese Wechselwirkung kann ebenfalls durch andere molekulare Interaktionen, einschließlich der Verwendung eines anderen oder zweiten Linkers, ausgeübt werden. Die Assoziierung des Spermiums, des Linkers und des einen Polynukleotids oder den mehreren Polynukleotiden kann ebenfalls in vitro oder in vivo auftreten.

[0014] Genetisch modifizierte Zellen oder nicht-menschliche Tiere können aus der Befruchtung einer tierischen Eizelle mit dem oben beschriebenen Vektor stammen. Die Befruchtung kann in vitro oder in vivo auftreten. Die genetische Modifizierung geschieht durch die vollständige oder teilweise Integration der Polynukleotidmoleküle in das Zell- oder Tiergenom. Ferner können Zellen, wie zum Beispiel Spermienzellen oder Eizellen, und Zelllinien aus diesen genetisch modifizierten nicht-menschlichen Tieren oder ihren Nachkommen abgeleitet werden.

[0015] Die genetisch modifizierten, nicht-menschlichen Tiere, die aus der Verwendung des Spermienvektors, der oben beschrieben wird, stammen, besitzen bestimmte gewünschte Eigenschaften. Beispiele dieser Eigenschaften schließen schnellere Wachstumsraten, Krankheits- oder Pathogenresistenz, hohe Produktion von bestimmten Proteinen in der Milch und Organe, die für die Xenotransplantation von Tieren auf Menschen geeignet sind, ein.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0016] [Fig. 1](#) ist eine bildliche Darstellung der grundlegenden Schritte, die an der Verwendung einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beteiligt sind.

[0017] [Fig. 2](#) zeigt das Ergebnis einer Durchflusscytometrie der Bindung eines spermien-spezifischen Antikörpers an Mausspermienzellen, wie sie durch einen Aspekt der vorliegenden Erfindung verkörpert wird.

[0018] [Fig. 3](#) zeigt das Ergebnis einer Durchflusscytometrie der Bindung eines spermien-spezifischen Antikörpers an Schweinespermienzellen, wie sie durch einen Aspekt der vorliegenden Erfindung verkörpert wird.

[0019] [Fig. 4](#) zeigt das Ergebnis einer Durchflusscytometrie der Bindung eines spermien-spezifischen Antikörpers an Rinderspermienzellen, wie sie durch einen Aspekt der vorliegenden Erfindung verkörpert wird.

[0020] [Fig. 5](#) zeigt das Ergebnis einer Durchflusscytometrie der Bindung eines spermien-spezifischen Antikörpers an Hühnerspermienzellen, wie sie durch einen Aspekt der vorliegenden Erfindung verkörpert wird.

[0021] [Fig. 6](#) zeigt das Ergebnis einer Durchflusscytometrie der Bindung eines spermien-spezifischen Antikörpers an Ziegenspermienzellen, wie sie durch einen Aspekt der vorliegenden Erfindung verkörpert wird.

[0022] [Fig. 7](#) zeigt das Ergebnis einer Durchflusscytometrie der Bindung eines spermien-spezifischen Antikörpers an Schaf spermienzellen, wie sie durch einen Aspekt der vorliegenden Erfindung verkörpert wird.

[0023] [Fig. 8](#) zeigt eine Plasmid-Karte von pCMV- β .

[0024] [Fig. 9](#) zeigt eine Agarose-Gel Analyse eines spermien-spezifischen Antikörpers, der an das pCMV- β Plasmid bindet.

[0025] [Fig. 10](#) zeigt die Ergebnisse einer PCR-Analyse für den Nachweis von pCMV- β Sequenzen in genomischer DNA, die aus Mäuseembryos, die gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung genetisch modifiziert wurden, isoliert wurde.

[0026] [Fig. 11](#) zeigt Ergebnisse einer Southern Blot Analyse für den Nachweis einer Gensequenz des Hepatitis B Oberflächen-Antigens in genomischer Mausschwanz-DNA, wobei diese Gensequenz gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung in das Mäusechromosom integriert ist.

[0027] [Fig. 12](#) zeigt die Plasmidkarte der pSEAP-2 Kontrolle.

[0028] [Fig. 13](#) zeigt die Ergebnisse einer Southern Blot Analyse für den Nachweis einer pSEAP-2 Kontrollplasmidsequenz in genomischer DNA, die aus Schwanzgewebe von gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung genetisch modifizierten Schweinen isoliert wurde.

[0029] [Fig. 14](#) zeigt die Anzahl der Kopien von integrierten pSEAP-2-Kontrollplasmiden in vier genetisch modifizierten Schweinen basierend auf den densitometrischen Intensitäten der Banden in [Fig. 13](#).

[0030] [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#) zeigen die Ergebnisse von Enzymassays für sekretierte alkalische Phosphatase, die im Serum von Schweinen gefunden wurde, die gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung genetisch modifiziert wurden.

Allgemeine Beschreibung der Erfindung

[0031] Allgemein zeigt [Fig. 1](#) die Grundschrte, die bei der Verwendung einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, um Zellen oder Tiere unter Verwendung eines Spermienvektors genetisch zu modifizieren, eingeschlossen sind. Kurz zusammengefasst, tierische Spermienzellen **10**, werden mittels Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, gesammelt oder kommerziell über Quellen wie zum Beispiel Birchwood Genetics in West Manchester, Ohio, erworben und mit den Linkern **20** verbunden. Diese Linker sind Antikörper, vorzugsweise Immunglobuline der Typen IgG, IgA oder IgM. Diese Linker binden oder assoziieren über verschiedene molekulare Wechselwirkungen, wie zum Beispiel ionische Wechselwirkungen, kovalente Bindungen, van-der-Waals Kräfte oder Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen an die äußere Oberfläche der Spermienzellen. Ringförmige oder lineare DNA-Moleküle **30** binden oder heften sich dann ebenfalls über verschiedene molekulare Wechselwirkungen, wie zum Beispiel ionische oder kovalente Bindungen, van-der-Waals Kräfte oder Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen an die Linker in dem Spermien-Linker-Komplex. Diese DNA-Moleküle können bestimmte Genprodukte kodieren, sie können aber auch, um ein Gen auszuschalten, unterbrochene Gene sein, die zu endogenen Genen homolog sind und die in das Chromosom durch Rekombination eingefügt werden. Der gebildete Spermien-Linker-DNA-Komplex **40** kann dann verwendet werden, um die Befruchtung in vivo oder in vitro durchzuführen. Bei der Befruchtung wird die DNA in das befruchtete Ei **50** und den Embryo **60** eingeführt und kann in das Chromosom integrieren, wodurch sie ein Teil des tierischen oder zellulären genetischen Materials wird.

[0032] Alternativ kann die Bindung, Kopplung, Verknüpfung, Anheftung oder Assoziierung des Spermien-Linker-DNA-Komplexes auch in vivo erreicht werden. Der Linker und die DNA können zuerst in vitro gekoppelt oder aneinander gebunden werden. Danach kann dieser Linker-DNA-Komplex direkt oder indirekt in den Hoden eines männlichen Tieres injiziert werden. Die PCT-Veröffentlichungen WO 99/40213 und WO 97/11597 offenbaren Verfahren zur Injektion von DNA in die Hoden.

[0033] Ein Beispiel eines Linker-DNA-Komplexes ist ein Antikörper mit angehefteten DNA-Molekülen, wobei der Antikörper spezifisch bestimmte Oberflächenepitope auf Spermienzellen erkennt. Aufgrund der sauren Eigenschaften von nackter DNA kann diese ionisch an einen Antikörper, der basische oder positiv geladene Eigenschaften besitzt, assoziieren, binden oder koppeln. Die DNA-Linker-Wechselwirkung ist jedoch nicht auf ionische Wechselwirkungen beschränkt. Der Komplex kann auch mittels im Stand der Technik gut bekannter Verfahren mit UV-Licht quervernetzt werden, um kovalente Bindungen zu bilden. Sowohl die DNA als auch der Linker können ebenfalls mit Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, modifiziert werden. Zum Beispiel kann die DNA, durch die Zugabe von biotinylierten Desoxynukleotiden zu einer PCR-Reaktion biotinyliert werden; der Antikörper kann mit Streptavidin modifiziert oder mit angeheftetem Streptavidin, das das Biotin auf der DNA fest bindet, erworben werden; oder ein Zweitantikörper, der mit Streptavidin modifiziert ist und den ersten Antikörper erkennt, kann als zweiter Linker zwischen der modifizierten DNA und dem ersten Linker fungieren.

[0034] Wenn der DNA-Linker-Komplex in den Hoden des nicht-menschlichen Tieres injiziert wird, kann dieser Komplex die Spermienzellen aufspüren und an diese binden. Die Befruchtung kann dann in vivo entweder über natürliche Kopulation der männlichen und weiblichen nicht-menschlichen Tiere oder durch künstliche Besamung des Weibchens mit gesammelten Spermienzellen erfolgen. Die gesammelten Spermienzellen können ebenfalls in in vitro Befruchtungstechniken, die im Stand der Technik gut bekannt sind, verwendet werden. Auf der anderen Seite kann die Befruchtung, wenn die Bindung des Spermien-Linker-DNA-Komplexes vollständig in vitro durchgeführt wurde, mittels in vitro Befruchtungstechniken erreicht werden. Die befruchteten Eizellen und resultierenden Embryos können dann für die Entwicklung in nicht-menschliche Ersatztiernütter transplantiert werden. Alternativ können bekannte künstliche Besamungsverfahren oder die direkte Injektion der Spermien-Linker-DNA-Komplexe in den Eileiter des nicht-menschlichen weiblichen Tiers ebenfalls die in vivo Befruchtung erreichen.

[0035] Genetisch modifizierte, nicht-menschliche Tiere können einer Reihe von nützlichen Anwendungen dienen. In Vieh, Geflügel oder Fisch können Gene eingeführt werden, die Wachstumshormone kodieren, um sie schneller als normal wachsen zu lassen, oder es kann das Somatotropin-Gen eingeführt werden, um das Mus-

kelwachstum zu erhöhen und das Fettgewebe zu verringern. Pursel, V. G., et. al. (1989) Genetic Engineering of Livestock, Science, Band 244, Seiten 1281-1288; Etherton, T.D., et. al. (1993) Mechanism by which Somatotropin Decreases Adipose Tissue Growth, American Journal of Clinical Nutrition, Band 58 (Supp.), Seiten 287S-295S. Eingeführte Gene, wie zum Beispiel Interferon, das das Immunsystem ankurbelt, oder andere Gene, wie zum Beispiel Gene, die für virale, Prion- oder bakterielle Proteine kodieren, können dieses Vieh, dieses Geflügel oder diesen Fisch krankheits- oder pathogenresistent machen. Beispiele für diese infektiösen Pathogene schließen Salmonellen, das Influenzavirus, die Prionproteine des Rinderwahnsinns etc. ein. Alternativ kann die Einführung von DNA, die Anti-Sense RNA Moleküle kodiert, die komplementär zu diesen viralen, Prion oder bakteriellen RNAs sind, auch die Translation oder die Herstellung von Proteinen aus diesen RNAs hemmen, was das Wachstum und die Verbreitung dieser infektiösen Pathogene begrenzt.

[0036] Außerdem kann die Einführung von Genen für biochemische Enzyme, die die raten-beschränkenden Aminosäuren produzieren, in nicht-menschliche Tieren, einschließlich Insekten, wie zum Beispiel Seidenraupen, die Rohmaterialien für Kleidung, wie zum Beispiel Wolle oder Seide herstellen, die Produktion dieser Rohmaterialien erhöhen. In Schafen begrenzt zum Beispiel die Verfügbarkeit der Aminosäure Cystein die Herstellung von Wolle. Die Einführung von bakteriellen Genen, die für Serin-Transacetylase und O-Acetylserin-Sulphydrolase kodieren, kann die Umwandlung von Serin und Acetyl-CoA in Cystein erhöhen, was wiederum die Produktion von Wolle erhöhen kann. Ward, K., (1991) The Application of Transgenic Techniques for the Improvement of Domestic Animal Productivity, Current Opinion in Biotechnology, Band 2, Seiten 834-839.

[0037] Ferner können diese genetisch modifizierten, nicht-menschlichen Tiere auch therapeutische Proteine, wie zum Beispiel Insulin, Wachstumshormon, Interferon, Erythropoietin, kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), t-PA oder Faktor VIII, durch das Verbinden der Gene für diese Proteine mit Promotoren von säugetierspezifischen Genen, wie zum Beispiel Schaf β -Lactoglobulin, Maus Molkesäureprotein oder Rinder α S1-Casein, in ihrer Milch produzieren. Id. Auf der anderen Seite kann die Milch des nicht-menschlichen Tieres auch durch den Zusatz von humanisierten Proteinen, wie zum Beispiel menschlichem Lactoferrin, das die intestinale Eisenabsorption in Kindern erhöht, ergänzt werden. Lonnerdal, B. (1996) Recombinant Human Milk Proteins – An Opportunity and a Challenge, American Journal of Clinical Nutrition, Band 63, Seiten 622-626. Genetisch modifizierte Schweine können unter Verwendung von Genen, wie zum Beispiel dem humanem C3-Convertase Inhibitor (decay accelerating factor), auch eine Quelle für stärker "humanisierte" Organe für die Xenotransplantation von Tieren auf Menschen sein. Cozzi, E., et. al. (1994) Expression of Human Decay Accelerating Factor in Transgenic Pigs, Transplantation Proceedings, Band 26, Seiten 1402-1403.

[0038] Die folgenden Beispiele zeigen, dass der Erfinder unter Verwendung des oben beschriebenen Spermienvektors, eine Reihe von genetisch modifizierten Tieren erzeugt hat. Verfahren der molekularen Genetik, Durchflussscytometrie, Antikörperherstellung, Hybridomtechnologie, in vitro Befruchtung, Embryomanipulation und künstliche Besamung, die in dieser Offenbarung verwendet aber nicht explizit beschrieben werden, wurden bereits ausführlich in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben. Diese Verfahren gehören zu den Fähigkeiten des Durchschnittsfachmanns.

Beispiel I

[0039] Dieses Beispiel zeigt die Herstellung eines spermienzell-spezifischen Antikörpers.

[0040] Spermienzellen, die männlichen Mäusen entnommen wurden, wurden als Antigene zurück in die Mäuse injiziert, um diese zu immunisieren und Antikörper herzustellen, die gegenüber Oberflächenantigenen von Spermien reaktiv sind. Monoklonale Antikörper, die unter Verwendung üblicher Hybridomtechniken entwickelt wurden, wurden unter Verwendung der Durchflussscytometrie untersucht, um Antikörperkandidaten zu identifizieren, die an eine Reihe verschiedener Tiere binden (Maus, Schwein, Rind, Schaf, Ziege und Huhn). Kurz zusammengefasst wurden Spermienzellen mit den verschiedenen primären monoklonalen Antikörpern inkubiert, gewaschen und weiter mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch Maus Immunglobulin erkennt. Dieser Zweitantikörper, der kommerziell erhältlich und im Stand der Technik gut bekannt war, war mit fluoreszierenden Molekülen, wie zum Beispiel Fluorescein oder Rhodamin, konjugiert. Wenn die Zweitantikörpermoleküle erst einmal gebunden und gewaschen waren, zählte das Durchflussscytometer oder der FACS-Sortierer die Anzahl an fluoreszierenden Spermienzellen mit daran gebundenen Erst- und Zweitantikörpern im Vergleich zu nackten Spermienzellen.

[0041] [Fig. 2-Fig. 7](#) zeigen diese Durchflussscytometrieanalysen für mAbC, das an die Spermienzellen von Maus, Schwein, Rind, Huhn, Ziege bzw. Schaf bindet. Die Y-Achse entspricht der Anzahl von nachgewiesenen Spermienzellen, während die X-Achse die relative Intensität der an die Zellen gebundenen Fluoreszenz wie-

dergibt. Schraffierte Signale zeigen Kontrollreaktionen, in denen die Spermienzellen nur mit dem fluoreszierenden Anti-Maus Immunglobulin Antikörper inkubiert wurden. Auf der anderen Seite zeigen die schattierten Signale die Reaktionen, in denen der mAbC Antikörper und der Zweitantikörper mit den entsprechenden Spermienzellen einer Maus, eines Schweins, eines Rinds, eines Huhns, einer Ziege bzw. eines Schafs inkubiert wurde. Die Rechtsverschiebung der Signale zeigt die positive Bindung des mAbC Antikörpers.

[0042] Wie in [Fig. 2](#) gesehen werden kann, können verglichen mit Spermienzellen, die nur mit dem fluoreszierenden Zweitantikörper inkubiert wurden, für Mausspermienzellen, die mit mAbC und dem fluoreszierenden Zweitantikörper inkubiert wurden, höhere Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden. Vergleichbar können in [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#), höhere Fluoreszenzen für Schwein- bzw. Rinderspermienzellen, die mit mAbC und dem fluoreszierenden Zweitantikörper inkubiert wurden, nachgewiesen werden, wie durch die rechten, schattierten Signale bewiesen wird.

[0043] In [Fig. 5](#) führte die Inkubation des Fluoreszenzantikörpers mit den Hühnerspermienzellen allein nicht zu einer für diese Spermienzellen nachgewiesenen Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu zeigt das rechte Signal Fluoreszenz in Hühnerspermienzellen mit daran angehefteten mAbC Antikörpern an. [Fig. 5](#) zeigt ebenfalls, dass ein Teil der Hühnerspermienzellen das Antigen, das durch mAbC erkannt wird, nicht exprimiert, wie durch das linke schattierte Signal bewiesen wird.

[0044] In [Fig. 6](#) kann die Fluoreszenz für Ziegensperma, das mit mAbC und dem fluoreszierenden Zweitantikörper inkubiert wurde, nachgewiesen werden, was durch die zwei rechten schattierten Signale bewiesen wird. Das linke schattierte Signal kann auf eine Population von Ziegenspermienzellen hindeuten, die das Antigen, das durch mAbC erkannt wird, in einer niedrigeren Konzentration exprimiert, als die Population in dem rechten Signal. Im Gegensatz zu den Hühnerspermienzellen, die in [Fig. 5](#) nur mit dem fluoreszierenden Zweitantikörper inkubiert wurden, scheint der fluoreszierende Anti-Maus Immunglobulin Antikörper ebenfalls, aber in einem gegenüber der Bindung über den mAbC-Linker deutlich verringerten Ausmaß, an die Ziegenspermienzellen zu binden.

[0045] In gleicher Weise kann in [Fig. 7](#) die Fluoreszenz von Schaf spermienzellen, die mit mAbC und dem fluoreszierenden Zweitantikörper inkubiert wurden, nachgewiesen werden, wie durch die rechten schattierten Signale bewiesen wird. Die Verteilung dieser Signale deutet erneut auf die Möglichkeit hin, dass verschiedene Spermienzellen verschiedene Mengen des Antigens, das durch mAbC erkannt wird, besitzen.

[0046] Wie aus den [Fig. 2](#), [Fig. 3](#), [Fig. 4](#), [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) erkannt werden kann, binden die Säugetier-Spermienzellen zu einem geringeren Grad an den fluoreszierenden Zweitantikörper. Da sich der Zweitantikörper gegen Maus Immunglobulin richtet, kann er eine Kreuzreaktivität gegenüber anderen Säugetierproteinen auf der Oberfläche von Spermienzellen, die in den Hühnerspermienzellen nicht vorhanden sind ([Fig. 5](#)), besitzen. Nichtsdestotrotz zeigt die Verschiebung der Fluoreszenzsignale bei der Zugabe von mAbC klar die gegenüber verschiedenen tierischen Spermienzellen höhere Affinität des mAbC Antikörpers.

Beispiel II

[0047] Dieses Beispiel zeigt die Fähigkeit des monoklonalen Antikörpers mAbC über ionische Wechselwirkungen an DNA-Moleküle zu binden.

[0048] Verschiedene Volumina gereinigter Lösungen mAbC in einer Konzentration von 0.5 mg/ml wurden zu DNA-Lösungen, die 300 ng Sall geschnittenes pCMV- β Plasmid enthielten ([Fig. 8](#), Clontech Laboratories, Inc., Cat. # 6177-1), gegeben. Nach der Inkubation der Mischungen bei Raumtemperatur für vierzig Minuten, wurden die Mischungen auf ein gewöhnliches, einprozentiges Agarosegel geladen und bei 20 Milli-Ampere für eine Stunde laufen gelassen. Danach wurde die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht.

[0049] In [Fig. 9](#) waren die Spuren 1, 2 und 8 Kontrollen, wobei Spur 1 reines Sall geschnittenes pCMV- β Plasmid und die Spuren 2 und 8 Sall geschnittenes pCMV- β Plasmid in modifiziertem Tyrode's Medium waren. Die Spuren 3, 4, 5, 6 und 7 entsprechen den experimentellen Reaktionen mit dem Sall geschnittenem pCMV- β Plasmid, das mit 0.2 μ l, 1 μ l, 2.5 μ l, 6 μ l und 10 μ l 0.5mg/ml mAbC inkubiert wurde. In den Spuren 5, 6 und 7 wurden in den Vertiefungen des Gels steigende Mengen von DNA zurückgehalten, was anzeigt, dass die Assoziation des Antikörpers, der eine positive Ladung besitzt, mit der Plasmid DNA, die eine negative Ladung besitzt, eine elektrische Nettoladung von null ergab, was zu einem Komplex führte, der nicht länger auf das elektrische Feld in dem Gel reagierte.

Beispiel III

[0050] Dieses Beispiel zeigt die Bindung oder Kopplung der DNA an das Sperma über den Linker oder Antikörper.

[0051] Unter Verwendung von Standardendmarkierungstechniken mit T4 DNA-Polymerase P^{32} markierte DNA-Moleküle wurden zusammen mit entweder mAbC, mAbD oder einem Kontrollantikörper, der für ein Drosophilaprotein spezifisch ist, mit Maus-, Schwein-, Hühner-, Schaf-, Ziegen- und Rinderspermienzellen inkubiert. Die Menge der DNA-Bindung wurde durch Szintillationszählung gemessen. Das Verhältnis von Spermienzellen zu Antikörper war wie folgt:

Maus – 400 Tausend Spermienzellen zu 600 ng markierter DNA;

Schwein – 600 Tausend Spermienzellen zu 800 ng markierter DNA;

Huhn – 300 Tausend Spermienzellen zu 500 ng markierter DNA;

Schaf – 1 Million Spermienzellen zu 500 ng markierter DNA;

Ziege – 1 Million Spermienzellen zu 500 ng markierter DNA;

und

Rind – 1 Million Spermienzellen zu 500 ng markierter DNA.

[0052] Tabelle 1 zeigt, dass mit der Anwesenheit von mAbC und mAbD die Spermienzellen verglichen mit den Reaktionen ohne Antikörper oder mit dem Drosophilaprotein-spezifischen Antikörper signifikant mehr markierte DNA banden. Die Reaktionen 1 und 2 enthielten nur Spermienzellen und markierte DNA, während Reaktionen 3 und 4 den Drosophilaprotein-spezifischen Antikörper zusammen mit Spermienzellen und markierter DNA enthielten. Die Reaktion 5 enthielt mAbD, während die Reaktionen 6 und 7 mAbC zusammen mit Spermienzellen und markierter DNA enthielten.

Tabelle 1

Reaktionen		Maus (cpm)	Schwein (cpm)	Huhn (cpm)	Schaf (cpm)	Ziege (cpm)	Kuh (cpm)
1	Kein Antikörper	12471	12971	5830	15367	17749	12766
2	Kein Antikörper	15814	13713	6383	13259	16574	14398
3	Kontrollantikörper	11541	10531	N/D	14018	155347	15351
4	Kontrollantikörper	13653	14038	N/D	12834	15997	13918
5	mAbD	18900	16220	10314	N/D	N/D	N/D
6	mAbC	18139	16269	7294	19368	20385	20417
7	mAbC	19314	17343	9865	18437	19543	18643

N/D = nicht bestimmt

Beispiel IV

[0053] Dieses Beispiel erläutert die Verfahren, die durchgeführt wurden, um genetisch modifizierte Mäuse zu erzeugen.

[0054] Aus dem entfernten Nebenhoden von neun bis zwanzig Wochen alten männlichen FVB-Mäusen wurden Spermienzellen entnommen. In kleine Stücke geschnitten wurden diese Nebenhodengewebe in 300 µl modifiziertem Tyrode's Medium bei einem pH von 7~8 für eine Stunde inkubiert, um den Spermienzellen zu erlauben, in das Medium zu entkommen. Wenn die Spermienzellen erst einmal in 300 µl Medium gesammelt waren, wurden bei 37°C für eine Stunde 5 Mikrogramm des Linkerantikörpers zu einer Million Spermienzellen zugegeben. Der Spermien-Linker-Komplex wurde drei Mal mit 300 µl modifiziertem Tyrode's Medium unter Verwendung einer Standardmikrozentrifuge, die für 1,5 Minuten auf 3000 rpm eingestellt war, gewaschen. Der Spermien-Linker-Komplex wurde schließlich in 300 µl Medium resuspendiert und ein Mikrogramm linearisiertes pCMV-β Plasmid oder ein Plasmid, das für das Hepatitis B Oberflächen Antigen (HbsAg) kodiert, zugegeben und für eine Stunde inkubiert.

[0055] Um ovulierte Eizellen zu entnehmen, erhielten neun bis zwölf Wochen alte weibliche FVB-Mäuse jeweils vier Tage vor dem Entnahmedatum eine Injektion von 5 I.U. Pregnant Mares Serum (PMS) und zwei Tage vor dem Entnahmedatum weitere 5 I.U. menschliches Choriongonadotropin (hCG). Entnommene ovulierte Eizellen umgeben von Kumuluszellen wurden bei Raumtemperatur in 35 mm Petrischalen, die einen Tropfen modifiziertes Tyrode's Medium enthielten, gegeben. Danach wurden 300 µl wie oben beschrieben hergestellter Spermien-Linker-DNA-Komplex direkt zu den ovulierten Eizellen gegeben. Die Gesamtmischung wurde bei 37°C mit oben aufgegebenem Mineralöl, um die Verdunstung zu verhindern, mit CO₂ äquilibriert. Nach vier Stunden der in vitro Befruchtung bei 37°C wurden befruchtete Eier mit Kapillarröhrchen gesammelt und drei Mal mit CZB Medium gewaschen. Die Embryos wurden für 20-22 Stunden weiter in 300 µl CZB Medium inkubiert, bevor sie in die Eileiter von pseudoschwangeren weiblichen Mäusen überführt wurden.

[0056] Um das Vorhandensein des pCMV-β Plasmids zu bestätigen, wurde genomische DNA, die zehn Tage nach der Transplantation in pseudoschwangere weibliche Mäuse aus Embryos isoliert wurde, unter Verwendung von Primern, die ein 480bp Fragment, das der CMV-Promotorregion des pCMV-β Plasmids entspricht ([Fig. 8](#)), nachweisen, mittels PCR analysiert. In [Fig. 10](#) zeigen die Spuren 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 24, 33 und 40 klar dieses 480bp PCR-Fragment. Die Spuren 1 und 21 entsprechen den Markern für die Molekülgrößen.

[0057] Um die Integration des HBsAg Plasmids in das Mäusegenom zu bestätigen, wurde ebenfalls eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Die genomische DNA, die aus Mäuseschwänzen isoliert wurde, wurde verdaut, auf einem Gel laufen gelassen, und gemäß Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, auf eine Nylonmembran übertragen. [Fig. 11](#) zeigt die Ergebnisse der Southern Blot Hybridisierung mit komplementären Sondensequenzen gegen HBsAg. Die Spuren 1-13 enthielten genomische DNA von Mäusen, die von pseudoschwangeren Mäusen, die Embryos empfangen, die mit Spermien-Linker-DNA-Komplex wie oben beschrieben befruchtet worden waren, geboren wurden; die Spuren C1-C7 enthielten genomische DNA von Mäusen, die unbehandelte oder nicht-transgene Mäuse waren. Die Spuren 4, 5 und 8 zeigen Banden, die für die HBsAg Sequenzen, die in das Mäusegenom integriert wurden, positiv sind, und demonstrieren somit, dass drei der dreizehn Mäuse genetisch modifiziert waren.

Beispiel V

[0058] Dieses Beispiel erläutert die Verfahren, die durchgeführt wurden, um genetisch modifizierte Schweine zu erzeugen.

[0059] Ejakulierte Spermienzellen von Schweinen wurden unter Verwendung von Verfahren, die allgemein auf dem Gebiet der Tierhaltung bekannt sind, gesammelt. Suspended in einem Milliliter Schweinefüllmedium (erworben von Merck, Deutschland, Ref. N.R. 13515/0001 – verdünnte Mischung M3 für Ebersperma), wurden fünfzehn Millionen Spermienzellen mit fünf Mikrogramm des Linker Antikörpers für vierzig Minuten bei Raumtemperatur mit dazwischen liegendem periodischem Schütteln inkubiert. Nach dem einmaligen Waschen der Spermien-Linkermischung mit Schweinefüllmedium und schließlich dem Resuspendieren der Mischung in 1,5 ml desselben Mediums, wurden fünf Mikrogramm der Plasmid pSEAP2-Kontrolle ([Fig. 12](#), Clontech Laboratories, Inc., Cat. # 6052-1) zugegeben und für vierzig Minuten bei Raumtemperatur mit der Mischung inkubiert. Die direkte Injektion von 200µl des resultierenden Spermien-Linker-DNA-Komplexes in die Eileiter von betäubten weiblichen Schweinen führte zur in vivo Befruchtung.

[0060] Nachdem die Schweine geboren und zu 70 Tage alten Schweinen herangewachsen waren, wurden sie hinsichtlich der Gegenwart des pSEAP2-Kontrollplasmids analysiert. [Fig. 13](#) zeigt die Southern Blot Analyse der genomischen DNA, die aus dem Schwanzgewebe dieser Schweine isoliert wurde. Kurz zusammengefasst wurde die genomische DNA, die von diesen Schweinen isoliert wurde, verdaut, auf einem Gel laufen gelassen und gemäß Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, auf eine Nylonmembran übertragen. Der Blot wurde dann mit markierten Sequenzen der NotI bis BamHI Region des pSEAP2-Kontrollplasmids, das in [Fig. 12](#) gezeigt ist, untersucht. In [Fig. 13](#) zeigt M die Markerspuren und 1-43 zeigen die Anzahl von analysierten Schweinen an. Die Hybridisierungssignale in den Spuren 5, 17, 19, 25, 26, 27, 28, 30, 36, 38, 39 und 40 zeigten an, dass das pSEAP2-Kontrollplasmid in das Genom des entsprechenden Schweins integriert wurde. In der unteren rechten Hälfte der Figur wurden acht Spuren mit ansteigender Kopienzahl der pSEAP2-Kontrollplasmidmoleküle (1, 2, 2, 4, 4, 8, 16 und 32) zusammen mit der DNA aus den Versuchsschweinen ebenfalls auf das Gel geladen. Diese acht Spuren wurden verwendet, um basierend auf den densitometrischen Intensitäten der Banden, die Anzahl der Kopien von pSEAP2-Kontrollplasmiden, die in die Schweine integriert wurden, abzuschätzen ([Fig. 14](#)). Wie in [Fig. 14](#) gesehen werden kann, besaß S5, das Spur 5 in [Fig. 13](#) entspricht, die höchste Intensität.

[0061] In einer anderen Studie wurde auch die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP), die von dem pSEAP-Kontrollplasmid exprimiert wurde, in 70 Tage alten genetisch modifizierten Schweinen nachgewiesen. Das Serum dieser Schweine wurde gesammelt und unter Verwendung des Clontech Great EscAPE™ SEAP Chemolumineszenz Nachweiskits (Cat. # K2041-1) und dessen Protokoll, das hierin durch Bezugnahme eingeschlossen ist, auf SEAP Aktivität untersucht. Das SEAP-Enzym, das von Clontechs pSEAP-2 Vektor exprimiert wird, ist thermostabil. Um den Level der SEAP Aktivität gegenüber der Aktivität des endogenen alkalischen Phosphataseenzyms des Schweins zu bestimmen, erforderte der Assay vor der Zugabe des Chemolumineszenzsubstrats somit die Inaktivierung des endogenen alkalischen Phosphataseenzyms durch Erhitzen der Proben auf 65°C für dreißig Minuten. Als Kontrolle zeigt [Fig. 15](#) das Ergebnis des Assays ohne die Durchführung des Schritts der Hitzeinaktivierung. Zwischen den genetisch modifizierten Schweinen und den nicht-transgenen Kontrollschweinen war der Grad an Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase nicht signifikant unterschiedlich. [Fig. 16](#) zeigt im Gegensatz dazu das Ergebnis einschließlich des Schritts zur Hitzeinaktivierung. Ohne die endogene alkalische Phosphataseaktivität war die SEAP Aktivität in den genetisch modifizierten Schweinen signifikant höher als in den nicht-transgenen Kontrollschweinen. Daher wurde das pSEAP2-Kontrollplasmid gut in das Schweinengenom integriert und exprimierte aktiv das SEAP-Enzym.

[0062] Die vorangehenden Beispiele zeigen, dass der Erfinder unter Verwendung des Spermienvektors, wie oben beschrieben, eine Reihe von genetisch modifizierten Tieren erzeugt hat. Diese Daten sind nur als Beispiele gedacht und es ist nicht beabsichtigt, dass die Erfindung auf diese Beispiele beschränkt ist.

Patentansprüche

1. Ein Vektor für die genetische Modifizierung von nicht-menschlichen Tieren oder Zellen umfassend: eine nicht-menschliche Spermienzelle, mindestens einen nicht auf Liposomen basierenden Linker, der auf der äußeren Oberfläche der nicht-menschlichen Spermienzelle gebunden ist, wobei der Linker ein Antikörper ist, und mindestens ein Polynukleotidmolekül, wobei das Polynukleotidmolekül über den einen nicht auf Liposomen basierenden Linker an die nicht-menschliche Spermienzelle gebunden ist.
2. Der Vektor gemäß Anspruch 1, wobei der Antikörper vorzugsweise an die äußere Oberfläche der nicht-menschlichen Spermienzelle bindet.
3. Der Vektor gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das mindestens eine Polynukleotidmolekül ein DNA-Molekül ist.
4. Der Vektor gemäß Anspruch 3, wobei das DNA-Molekül für ein Genprodukt kodiert.
5. Der Vektor gemäß Anspruch 4, wobei das Genprodukt ein RNA-Molekül ist.
6. Der Vektor gemäß Anspruch 4, wobei das Genprodukt ein Protein ist.
7. Der Vektor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Antikörper mit dem mindestens einem Polynukleotidmolekül über molekulare Wechselwirkungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus ionischer Wechselwirkung, kovalenter Wechselwirkung, van der Waals Wechselwirkung und Ligand-Rezeptor Wechselwirkung wechselwirkt.
8. Der Vektor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Antikörper mit dem mindestens einem Polynukleotidmolekül über mindestens einen nicht auf Liposomen basierenden zweiten Linker wechselwirkt.
9. Der Vektor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das mindestens eine Polynukleotidmolekül über den Antikörper an die äußere Oberfläche der nicht-menschlichen Spermienzelle bindet.
10. Ein nicht auf Liposomen basierender Linker zur Anheftung von mindestens einem Polynukleotidmolekül an die äußere Oberfläche einer nicht-menschlichen Spermienzelle, wobei der Linker ein Antikörper ist, und wobei der Antikörper an die äußere Oberfläche der nicht-menschlichen Spermienzelle und an das Polynukleotidmolekül gebunden ist.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

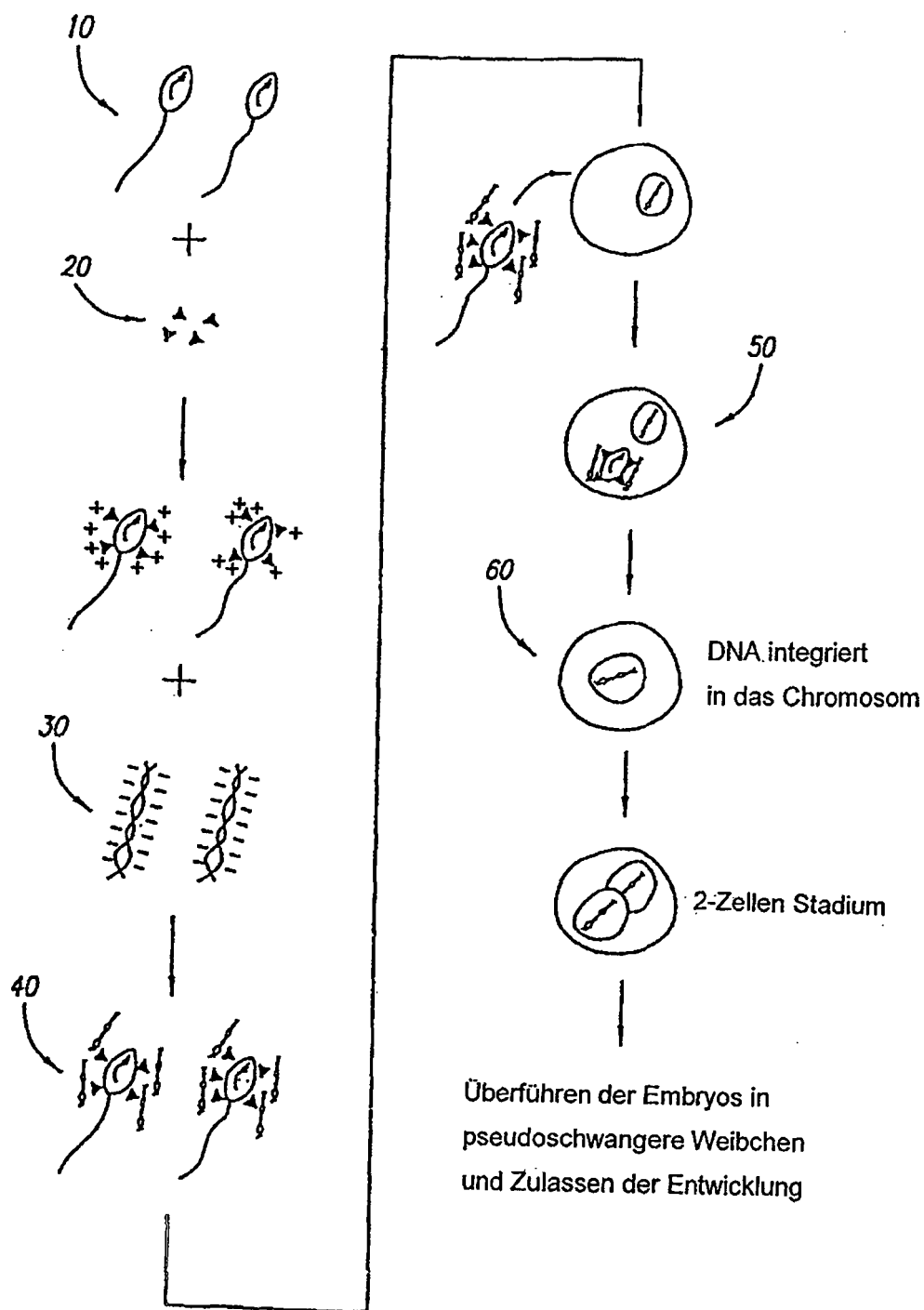


FIG. 1

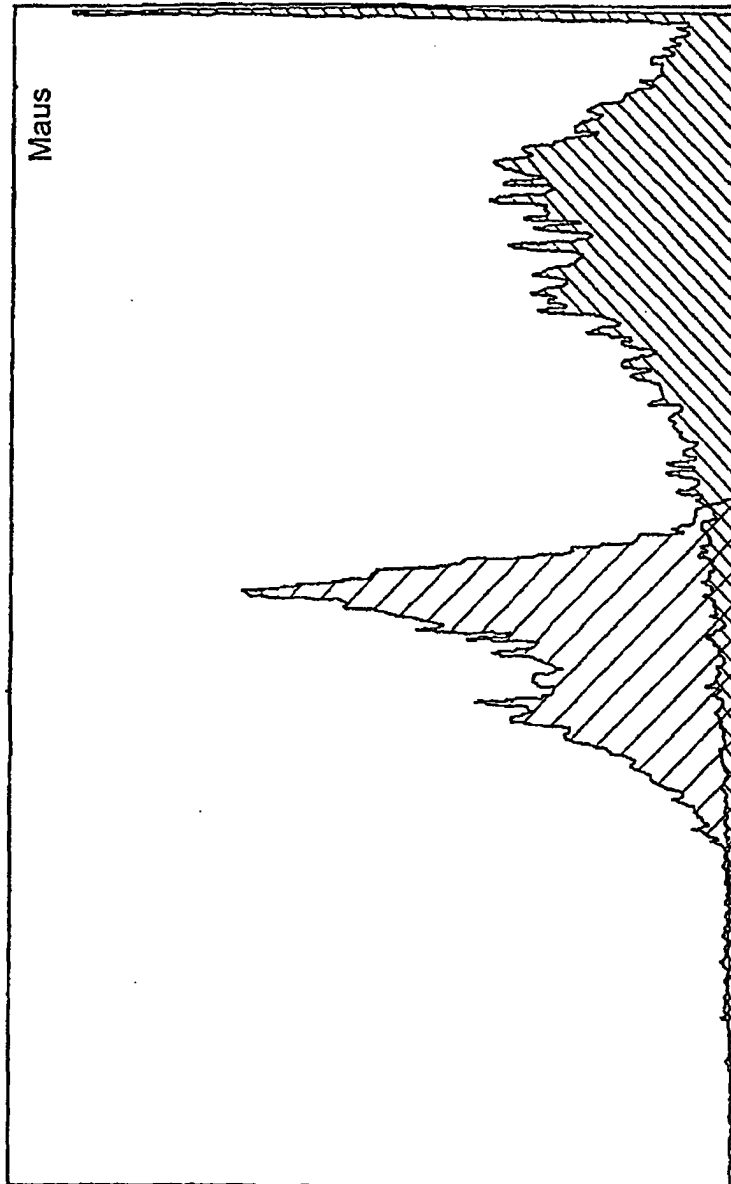


Fig. 2

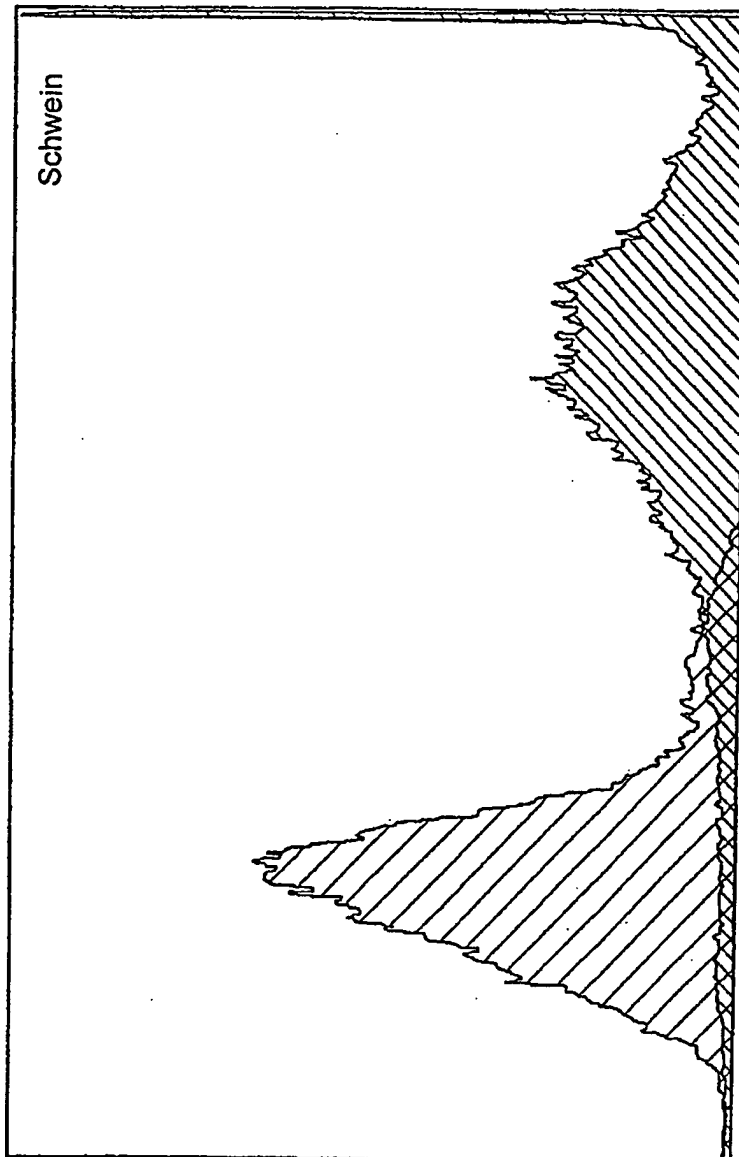


Fig. 3

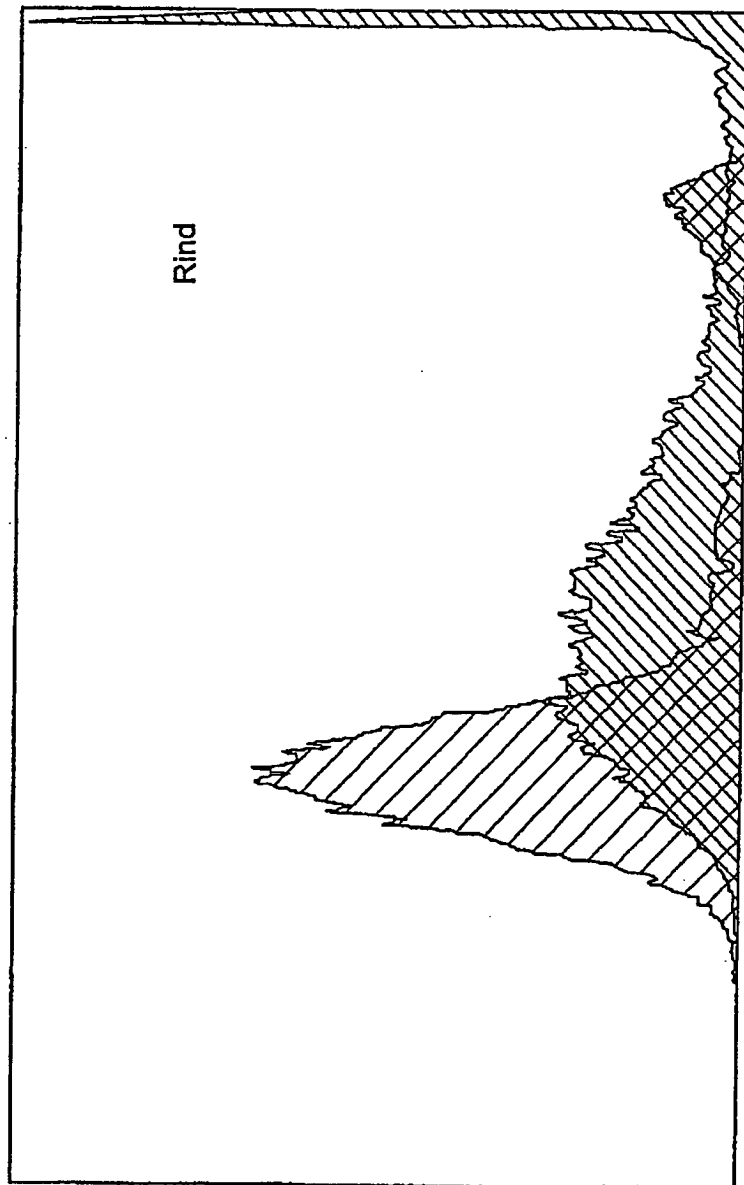
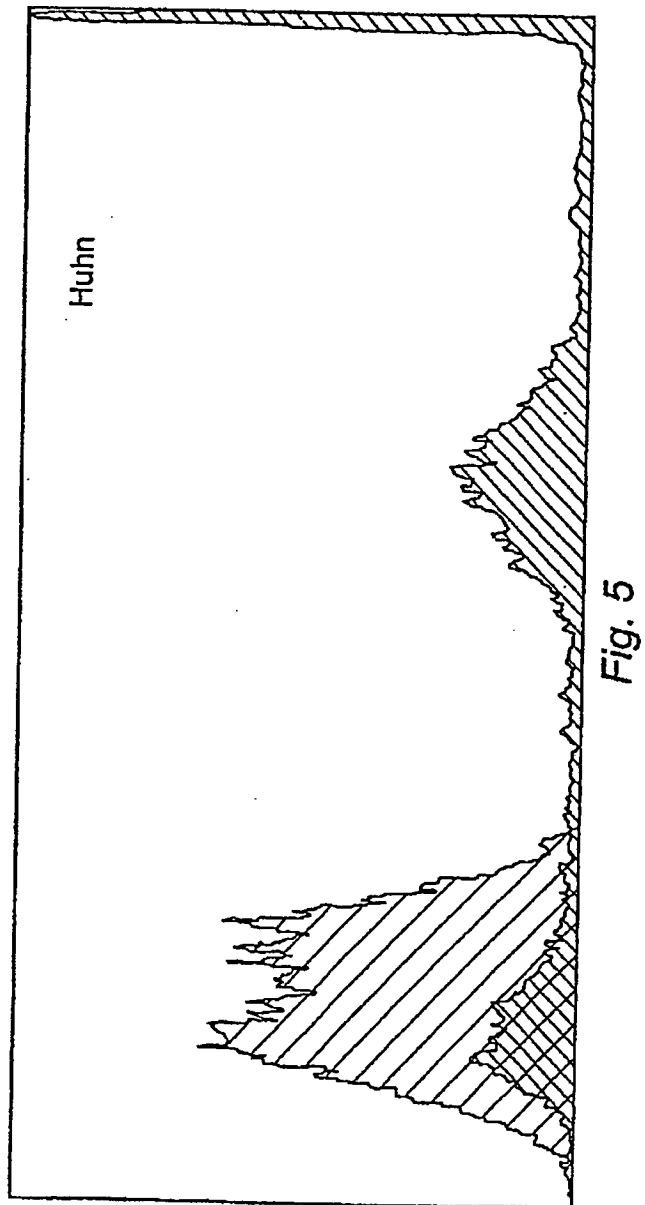


Fig. 4



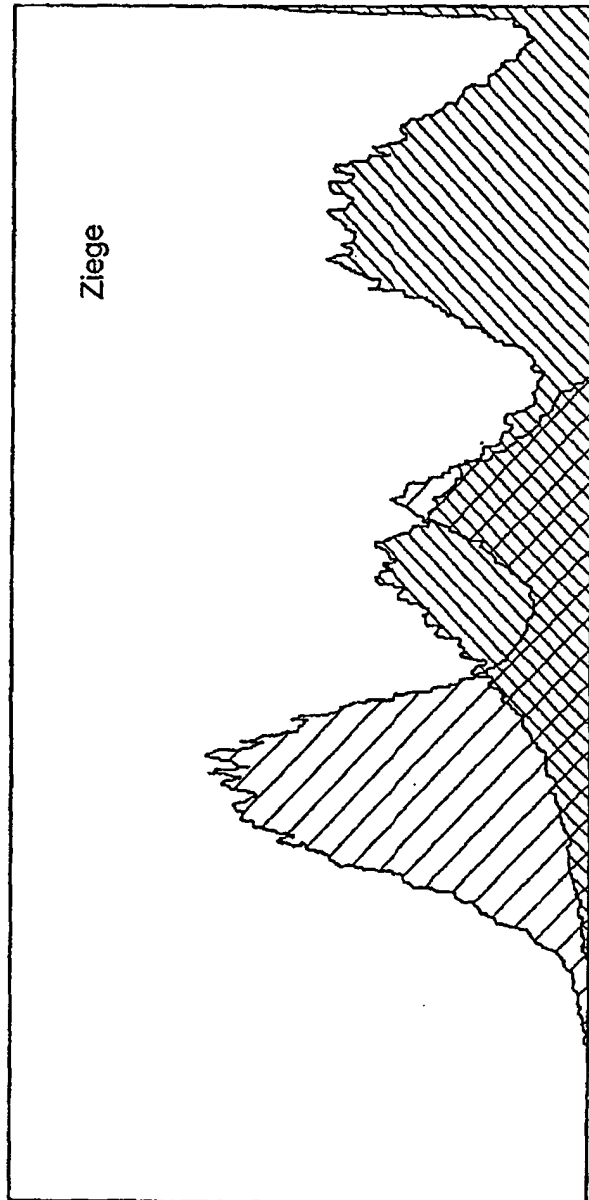


Fig. 6

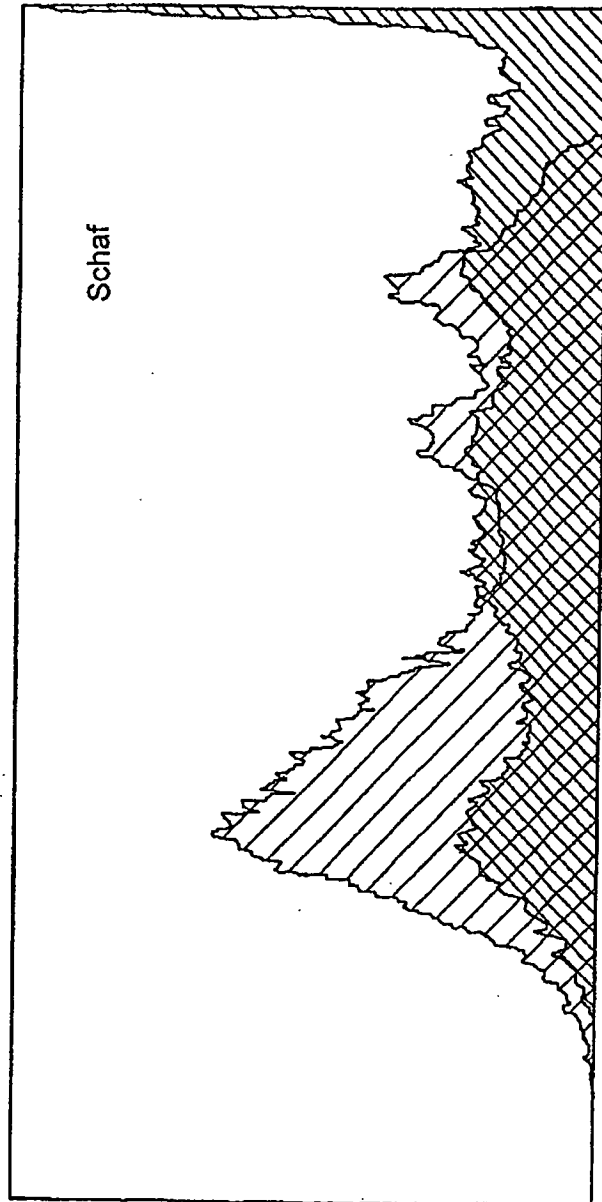


Fig. 7

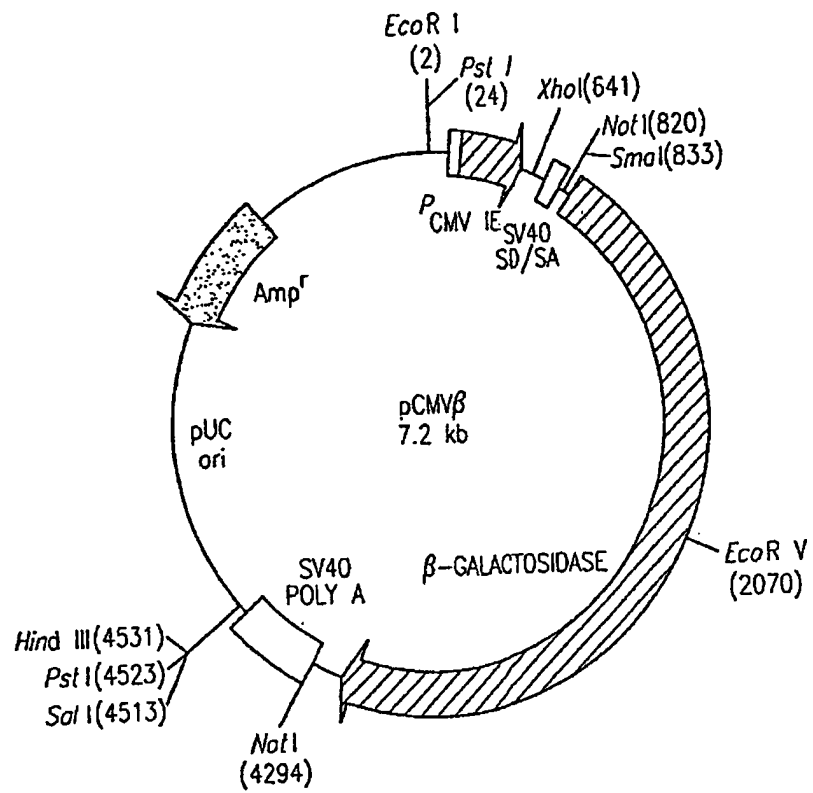
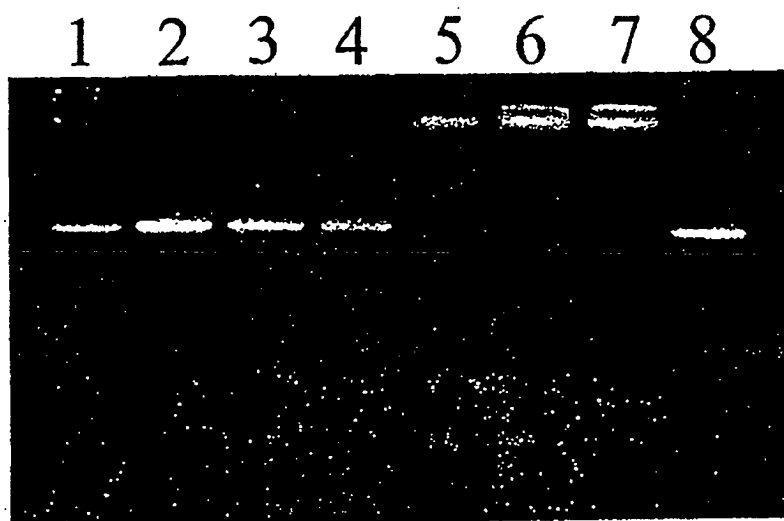


Fig. 8



lane 1: *Sal* I geschnittene pSEAP-2 Kontroll-DNA
lane 2: *Sal* I geschnittene pSEAP-2 Kontroll-DNA in modifiziertem Tyrode's Medium
lane 3: *Sal* I geschnittene pSEAP-2 Kontroll-DNA + 0.1 µg mAbC
lane 4: *Sal* I geschnittene pSEAP-2 Kontroll-DNA + 0.3 µg mAbC
lane 5: *Sal* I geschnittene pSEAP-2 Kontroll-DNA + 1.0 µg mAbC
lane 6: *Sal* I geschnittene pSEAP-2 Kontroll-DNA + 3.0 µg mAbC
lane 7: *Sal* I geschnittene pSEAP-2 Kontroll-DNA + 10.0 µg mAbC
lane 8: *Sal* I geschnittene pSEAP-2 Kontroll-DNA in modifiziertem Tyrode's Medium

Fig. 9

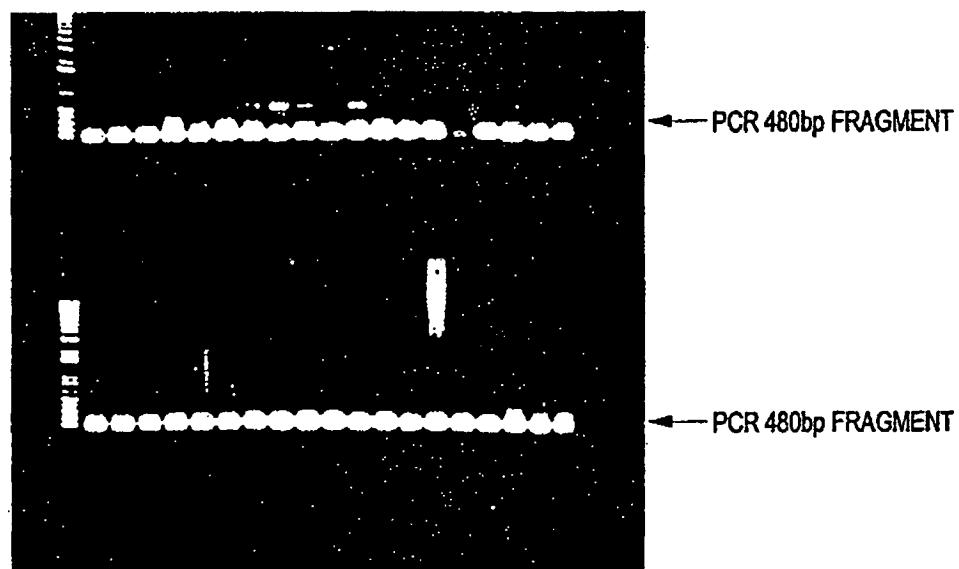


Fig. 10

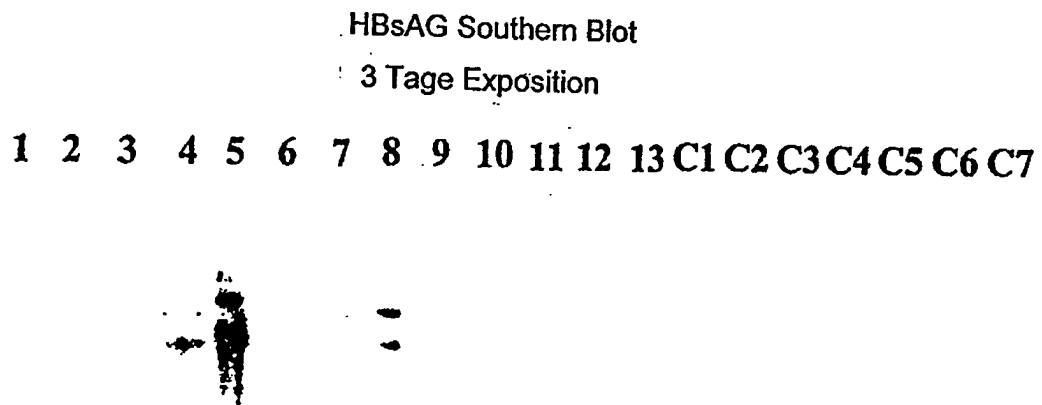


Fig. 11

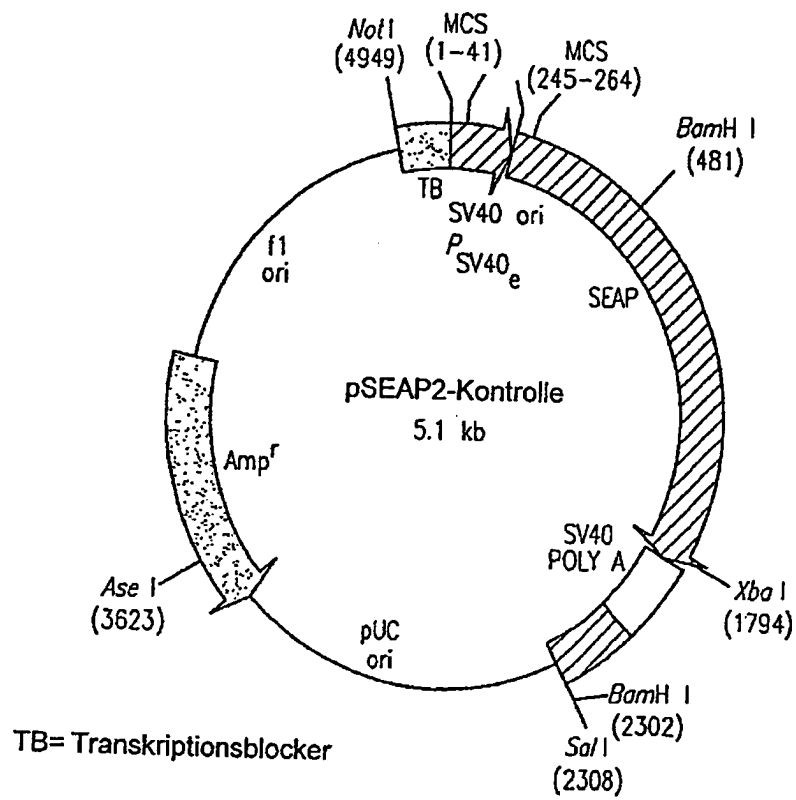


Fig. 12

Schweineschwanz-DNA Southern Blot

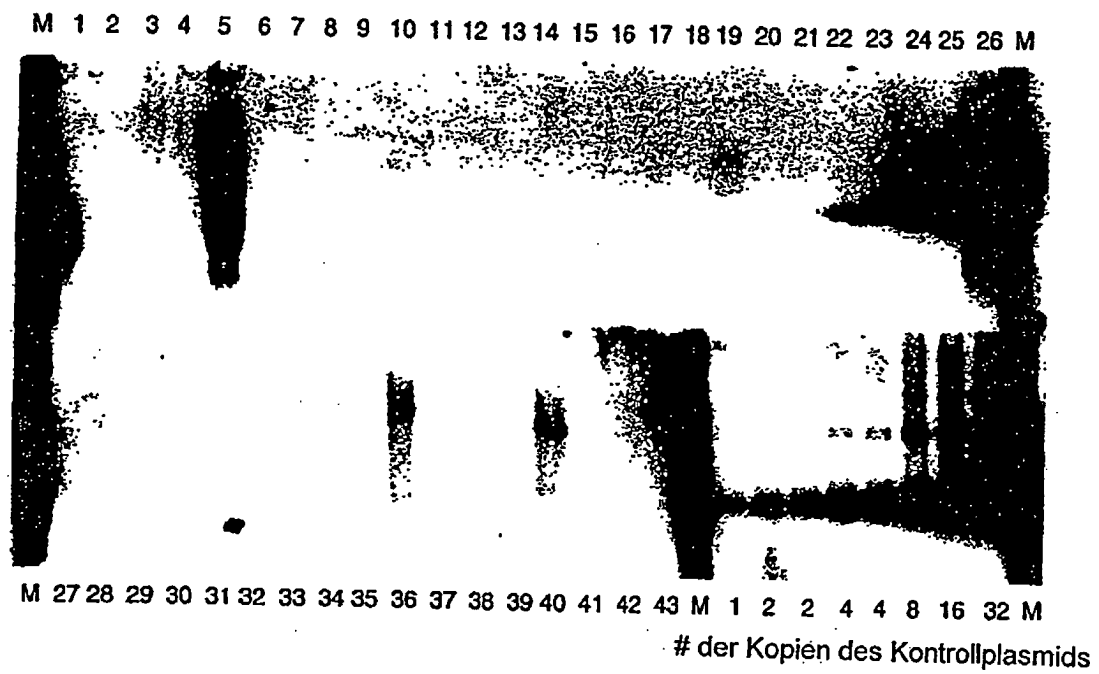


Fig. 13

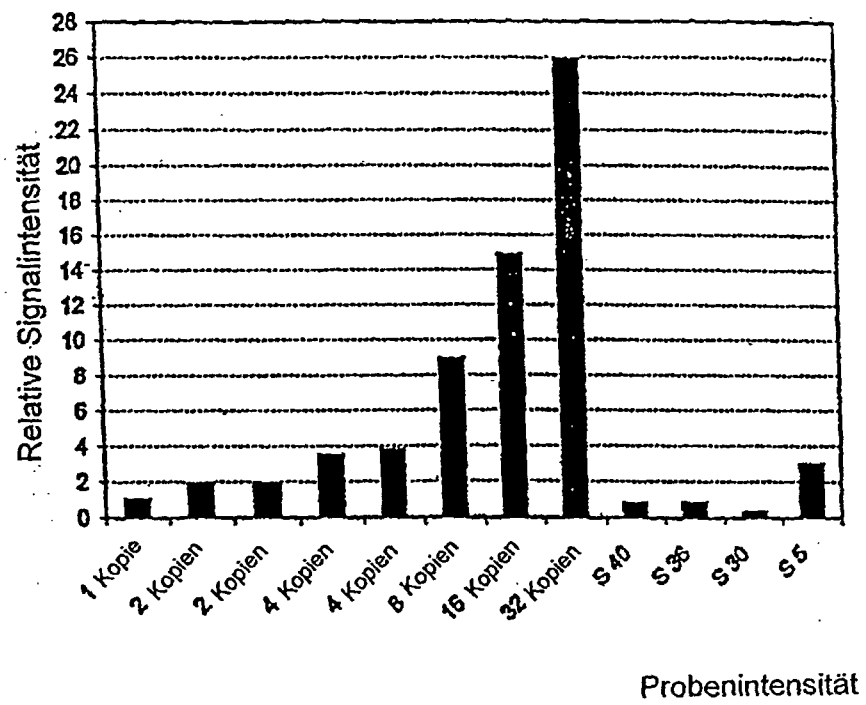


FIG. 14

Fig. 15
Assay der sekretierten alkalischen Phosphatase
nicht erhitzt

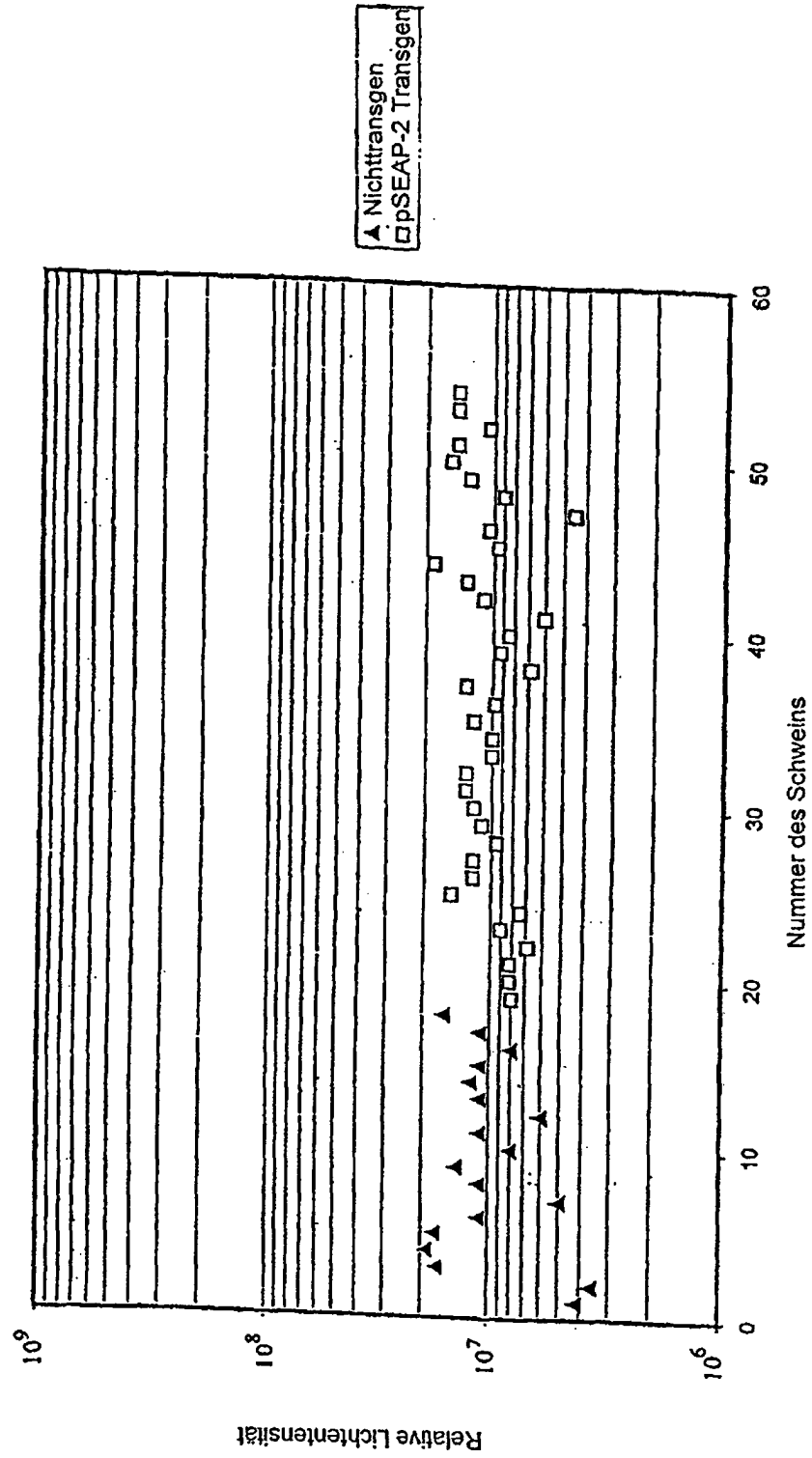


Fig. 16

Assay der sekretierten alkalischen Phosphatase
erhitzt

