



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 342**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/87** (2006.01)  
**A01K 67/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05812957 .8**  
96 Fecha de presentación : **05.10.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1943345**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **Un procedimiento para la transferencia de vectores episomales en células animales.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.08.2011**

73 Titular/es:  
**Università degli Studi di Milano - Bicocca**  
**Piazza dell'Ateneo Nuovo, 1**  
**20126 Milano, IT**

72 Inventor/es: **Lavitrano, Marialuisa;**  
**Bacci, Maria, Laura;**  
**Forni, Monica;**  
**Lipps, Hans, Joachim y**  
**Donini, Pierluigi**

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

**ES 2 364 342 T3**

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

Un procedimiento para la transferencia de vectores episomales en células animales

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la transferencia de secuencias de ADN y/o genes exógenos en células animales no humanas, y en particular, a un procedimiento para la transferencia de secuencias de nucleótidos en células espermáticas no humanas. Además, la invención se refiere al uso de células espermáticas, así modificadas, para la fecundación de óvulos no humanos para crear animales transgénicos no humanos o individuos genéticamente modificados.

### **Antecedentes de la Invención**

15 La creación de animales transgénicos no humanos o individuos genéticamente modificados, es decir, individuos cuyo genoma ha sido modificado por la introducción permanente de ADN exógeno, ha adquirido más importancia que nunca por ejemplo en estudios de regulación génica, con fines terapéuticos y para la producción de ganado. En particular, ciertos animales no humanos pueden crearse para incrementar la producción de leche, para ser resistentes a patógenos, para uso experimental en el desarrollo de fármacos novedosos o, incluso, para xenotrasplantes.

Sin embargo, hasta la fecha, la creación de tales animales es muy compleja y problemática.

25 El xenotrasplante, por ejemplo, pertenece a una rama particular de la biotecnología y la medicina implicada en el trasplante de células, tejido y órganos derivados de individuos que pertenecen a distintas especies. Esta rama se conoce desde hace algún tiempo pero encuentra dificultades significativas en la aplicación práctica, debido a los problemas asociados con el rechazo de los órganos trasplantados. De hecho, se sabe que el sistema inmune del organismo receptor reconoce el órgano trasplantado como extraño e inicia una serie de reacciones que conducen al llamado rechazo del órgano extraño.

30 El objetivo del xenotrasplante clínico podría ser el de sustituir un órgano humano enfermo con órganos de animales, en tales condiciones por las que se evite el problema del rechazo.

35 Con el fin de solucionar este problema, junto con los problemas asociados con la producción de animales para otros fines tales como aquellos enumerados anteriormente, se ha propuesto la creación de animales transgénicos o más bien animales que han sido modificados genéticamente, para que lleven secuencias génicas definidas normalmente no presentes en sus genomas. En otras palabras, hay un intento de insertar secuencias de ADN que codifican la expresión de proteínas que ayudan a evitar los problemas anteriormente mencionados relacionados con el rechazo, en el ADN de ciertos animales diana.

40 Generalmente, la técnica más comúnmente usada para la inserción de ADN exógeno en células animales consiste en la microinyección de ADN exógeno en el pronúcleo masculino de un cigoto. Esta técnica, aunque ha demostrado ser exitosa en ratones, no ha mostrado grado alguno de éxito en ganado, tal como cerdos, que son de interés significativo para xenotrasplantes y otras biotecnologías, limitando de este modo su uso general.

45 Lavitrano y cols. (1989, Cell 57, 717-723) han propuesto un procedimiento alternativo para la producción de animales transgénicos, conocido como "Transferencia de Genes Mediada por Espermatozoides" (SMGT) que se basa en el descubrimiento de la capacidad de las células espermáticas para unir e "internalizar" ADN exógeno (captación de ADN), transformándolas en vectores para la transmisión de no sólo su propio material genético, sino también del ADN exógeno de interés.

50 Ventajosamente con respecto a otras tecnologías transgénicas, el procedimiento anteriormente resumido no requiere ningún equipo caro tal como microinyectoras o micromanipuladores, no requiere ninguna operación delicada tal como microinyección y la intervención de personal técnico especializado. Además, el procedimiento de SM-GT ha mostrado por sí mismo ser generalmente efectivo para una gran variedad de animales transgénicos con porcentajes variables de genes positivamente insertados en cigotos y expresados (Lavitano y cols., Mol Rep. and Dev. 64: 284-291, 2003).

60 Además, la eficacia de la frecuencia de transferencia de los genes exógenos a una progenie por microinyección en algunos casos, como por ejemplo en cerdos, no ha proporcionados resultados satisfactorios. Además, se ha observado que el ADN exógeno se inserta al azar en el ADN del huésped, teniendo como resultado ocasionalmente el bloqueo o la alteración de la transcripción de un gen funcional. De hecho, la inserción de secuencias de ADN exógeno tiene lugar por recombinación con el ADN del huésped de una forma totalmente al azar, por la que puede incluso insertarse dentro de la secuencia de un gen funcional, alterando así completamente su transcripción. Es más, se ha observado que los vectores de integración para moléculas de ADN sufren el así llamado fenómeno de "silenciamiento" génico, es decir, no se ha detectado ninguna transcripción ni expresión de los genes insertados en

el genoma del huésped.

En particular, en busca de obviar el problema de la transcripción alterada del ADN huésped, es necesario diseñar secuencias de ADN para inserción de vectores plasmídicos que contengan dicho ADN con mucho cuidado y, en cualquier caso, siempre hay un porcentaje significativamente alto de casos donde es imposible predecir en qué sitio en el ADN del huésped puede insertarse el ADN exógeno y las consecuencias que esto puede causar, incluso a la progenie una vez ello se les transmite.

### **Sumario de la invención**

El problema central de la presente invención es por tanto el de proporcionar de forma general un procedimiento para la inserción de secuencias de ADN y/o de material genético exógeno en el interior de una célula huésped de forma que se eviten los inconvenientes anteriormente mencionados.

Este problema se resuelve por un procedimiento para la inserción de material genético exógeno en una célula huésped también células germinales masculinas, en una manera tal que no se interfiera en el material genético del huésped y en una manera tal que se transfiera al óvulo y a las células embrionarias que se derivan inalterado, según lo comunicado en la reivindicación principal adjunta.

Un primer objeto de la invención es por lo tanto el de proporcionar un procedimiento para la inserción segura y fiable de ADN exógeno en una célula huésped germinal masculina no humana.

Un segundo objeto de la invención es un procedimiento para la fecundación de un óvulo no humano que comprende el uso de una célula espermática obtenible según el primer objetivo de la invención.

Adicionalmente se divulga un procedimiento para la creación de individuos genéticamente modificados que comprende el procedimiento de fecundación según el segundo objeto de la invención.

### **Breve descripción de las figuras**

Las ventajas y características adicionales de la presente invención se comprenderán mejor a partir de la descripción detallada a continuación, que se da meramente a modo de ejemplo no limitante, con referencia a las figuras adjuntas en las que:

- La figura 1 representa un esquema del plásmido pGFP-C1;
- La figura 2 representa un esquema del plásmido pTX-E20;
- La figura 3 representa un esquema del vector plasmídico episomal pEPI-eGFP;
- Las figuras 4A y 4B representan un experimento de evolución temporal de la captación de plásmidos circulares pEPI-eGFP y pGFP-C1 traducidos por traducción de mella;
- Las figuras 5A y 5B representan el resultado de la RT-PCR usando ARN de hígado, músculo y corazón de fetos;
- Las figuras 6A-6D representan análisis histológicos de tejido muscular de distintos animales;
- La figura 6E representa un histograma de la frecuencia de distribución de puntos fluorescentes en relación con un área fija escaneada y relacionada con la expresión de la proteína fluorescente variante de GFP "Aequorea Victoria" en algunas muestras;
- Las figuras 7A y 7B representan análisis de ADN extracromosómico obtenido por extracción de Hirt (Hirt, 1967) sometido a prueba de bandas de Southern (7A) y a análisis por enzimas de restricción (7B).

### **Descripción detallada de la invención**

La idea central de la presente invención es la de explotar las capacidades de replicación y expresión y las características de determinados vectores plasmídicos de ADN, tal como para obtener la correspondiente expresión y replicación de ADN exógeno de forma que sea completamente autónoma con respecto a la replicación y expresión del ADN del huésped.

Tales capacidades y características se han observado en vectores episomales, que no son otra cosa que construcciones de ADN circular autorreplicativas autónomas que no están integradas en el ADN del huésped y, por lo tanto, no provocan los inconvenientes anteriormente mencionados.

Por lo tanto, el procedimiento según la presente invención comprende las etapas de:

- proporcionar un vector o un minicromosoma de tipo episomal que comprenda al menos una secuencia de nucleótidos y/o una secuencia génica de interés que debe transferirse al huésped y expresarse;
- proporcionar células germinales masculinas no humanas vivas;
- incubar dichas células germinales masculinas vivas tratadas con dicho vector episomal, para permitir la unión del vector y opcionalmente su entrada al núcleo de las células germinales masculinas.

#### Características del vector episomal

Los vectores episomales generalmente pueden ser víricos y no víricos y pueden ofrecer las ventajas de no integrarse en el genoma de la célula huésped, de ser capaces de autoreplicarse durante el ciclo de la célula huésped, y de segregarse en las generaciones hijas del huésped por sí mismos.

Preferentemente, se han usado vectores con replicación episomal estable que comprenden al menos una región para unir a la estructura nuclear/matriz conocida como S/MAR (aislada y caracterizada según el párrafo 23) y para actuar como un origen de replicación del vector en células de mamíferos. Algunas versiones de tales vectores también contienen el origen mínimo derivado del virus SV40 para asegurar la replicación autónoma del vector. Se demostró subsiguientemente que esto es innecesario, dado que la presencia del S/MAR es suficiente para la replicación de esta clase de vectores episomales. En cualquier caso, los vectores también pueden comprender un origen de replicación (ORI) procariota para la replicación del vector en la bacteria *Escherichia coli* y/o orígenes de replicación víricos y/o eucariotas. Vectores de este tipo se describen, por ejemplo, en Piechaczek y cols. (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, N.º 2, 426-428).

Las regiones S/MAR están representadas por secuencias de ácidos nucleicos que son capaces de subdividir la cromatina de cromosomas eucariotas en dominios discretos, particularmente en dominios conectados topológicamente conocidos como dominios bucle (Luderus, ME y cols., 1994, Mol. Cell Biol., 14, 6297-6305). Los dominios están unidos por secuencias que se acumulan específicamente en la matriz nuclear o en la estructura nuclear. Estas secuencias, conocidas como S/MAR son usualmente de varios miles de pares de bases de longitud y son ricas en adenosina y timina (aproximadamente el 70%). Las secuencias S/MAR preferidas para la siguiente invención son aquellas de origen mamífero, más preferentemente de origen humano. Estas secuencias S/MAR se aíslan por medio de procedimientos estándar (Krawetz, S.A., Draghici, S., Goodrich, R., Liu, Z., Ostermeier, G.C.: In silico and wet-bench identification of nuclear matrix attached regions. Meth. Mol. Med. 2004, 439-458), estando caracterizada su estructura (Goetze, S., Gluch, A., Benham, C., Bode, J.: Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon cluster. Potential of predicting functional domains. Biochemistry 42, 154-166, 2003). La longitud mínima de dichas secuencias debería ser de aproximadamente 800 pb (Jenke y cols., PNAS). Por ejemplo, la secuencia particularmente preferida se ha seleccionado a partir de la región 5' del gen humano del interferón  $\beta$ , aislada como un fragmento EcoRI/BglIII de 2,0 kb del plásmido pTZ-E20 (Bode y cols., 1992, Science 255, 195-1997) o como el fragmento S/MAR 1,7 obtenido en el sitio de polienlace por la escisión con EcoRI/BglIII.

En referencia a las secuencias de los sitios de origen de replicación (ORI), esto significa secuencias del sitio para la iniciación de la replicación en procariotas, eucariotas y virus.

Además, los vectores usados son vectores de expresión, es decir, vectores donde un gen que codifica una o más proteínas o péptidos está bajo el control de las secuencias reguladoras de genes que son específicas. Dichos vectores también están provistos de promotores, operadores y terminadores y secuencias de sitios de unión a ribosomas para la correcta transcripción y traducción. Preferentemente, los vectores se han diseñado de forma que no incluyen ninguna secuencia de nucleótidos para factores de replicación que actúen en trans, especialmente víricos, para evitar cualquier tipo de transformación celular o respuesta inmune debidas a su expresión.

Además, los vectores preferentemente no contienen ninguna secuencia de nucleótidos que codifique cualesquiera proteínas víricas y particularmente, proteínas capaces de actuar como factores de replicación en trans, tales como por ejemplo, el bien conocido "antígeno T grande" del virus SV40, que puede actuar como un inductor de tumores y como factor de "inmortalización".

Los sitios de origen de replicación (ORI) pueden seleccionarse a partir de aquellos de los sitios de replicación vírica tales como EBV-ORI, BPV-ORI o, en particular, SV40-ORI y preferentemente a partir de los sitios de origen de replicación usados para la propagación en células eucariotas. Obviamente, un experto en la técnica puede modificar el vector tal como para insertar varios sitios de orígenes de replicación según exigencias o preferencias particulares.

Los vectores episomales usados en la invención pueden contener además uno o más genes de resistencia a antibióticos. Su papel permite la selección y comprobar si la transfección o la transformación de las células tratadas ha tenido lugar o no. Entre los antibióticos usados más comúnmente, se pueden citar, a modo de ejemplo, kanamicina, gentamicina, gentamicina, ampicilina, tetraciclina, estreptomycin, espectinomycin, ácido nalidixico,

rifampicina, cloranfenicol y zeocina.

Un vector de partida particularmente preferido es pGFP-C1 (Clontech UK LTD.) (figura 1), en el que se han insertado el origen de replicación SV40 ORI y una secuencia de región de unión a la estructura nuclear/matriz (S/MAR) aislada y caracterizada como se divulga en el párrafo 23, derivada de la región 5' del gen del interferón  $\beta$  humano aislado del plásmido pTX-E20 como un fragmento EcoRI/BglII de 2 kb (figura 2). El mapa de restricción del plásmido resultante pEPI-1 se muestra en la figura 3 (Piechaczek y cols., Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, N.º 2, 26-428; Glover y cols., Nature Reviews Genetics, publicado en línea el 10 de marzo de 2005).

Además, otros derivados de pEPI-1 adecuados que pueden usarse según la presente invención están representados por pEPI-RSV, pDiMAR, pTetMAR, pMAR, como se divulga en Jenke y cols. (Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome, Methods, PNAS, 3 de agosto de 2004, vol. 101, n.º 31).

Debe señalarse que las modificaciones hechas en el plásmido comercial pGFP-C1, o en otros plásmidos de partida análogos, con el fin de obtener el plásmido de interés se han realizado según las técnicas de biología molecular que son ampliamente conocidas en la técnica (Maniatis y cols., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York) por lo que no se entrará en cualquier detalle adicional aquí.

Además, el vector de la invención puede incluir elementos promotores que pueden estar representados por promotores adecuados insertados en el extremo 5' incluyendo promotores o "potenciadores" constitutivos, específicos de ciclo celular, específicos de tejido y regulados o inducibles metabólicamente.

Los genes de interés que pueden insertarse en el vector episomal comprenden genes que codifican proteínas de interés terapéutico tales como por ejemplo el gen hDAF (factor de aceleración del decaimiento humano), o genes que desarrollan ciertas condiciones del huésped para fines de investigación.

Los vectores episomales que se acaban de describir también pueden usarse para transfección en células espermáticas en asociación con coadyuvantes, estabilizantes y sustancias que promueven la transfección. Además, pueden usarse vectores especiales, conocidos como vectores de transfección, que promueven la transfección cuando se usan en combinación con los vectores episomales.

Según una realización particularmente preferida de la invención, los vectores episomales pueden incluirse dentro de vehículos, por ejemplo vehículos de tipo farmacéutico tales como liposomas, para aumentar adicionalmente el nivel de transfección gracias a la barrera que protege contra la acción de las ADNasas.

Además, el complejo liposoma-vector episomal puede incluir proteínas de unión a ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, proteínas cromosómicas HMG o histonas como H2A, H2B, H3, con la ventaja de que la expresión del gen integrado de interés puede incrementarse.

De forma similar, pueden usarse polipéptidos que contienen histidina con el fin de aumentar la facilidad de paso a través de la membrana plasmática y por lo tanto la entrada en la célula huésped, mientras que la unión del vector al liposoma puede lograrse por el uso de una cisteína C-terminal.

Según una realización de la invención, alternativamente al uso de vectores plasmídicos episomales, pueden usarse cromosomas humanos artificiales (HAC). Estas estructuras están representadas por construcciones de moléculas de ADN que se parecen a cromosomas naturales porque son capaces de replicación y de mantenimiento de un número de copias definido y bajo dentro de las células huésped (Glove y cols., Nature Reviews Genetics, publicado en línea el 10 de marzo de 2005). Un ejemplo de estos cromosomas se describe en Ebersole y cols. (Mammalian artificial chromosomes formation from circular alphoid input DNA does not require telomere repeats Hum. Mol. Genet 9, 1623-1631, 2000).

Un enfoque particular para la creación de HAC implica la truncación de cromosomas de mamíferos hasta minicromosomas mitóticamente estables de 1-10 Mb constituidos por disposiciones de alfa-satélites (Farr y cols., Generation of human X-derived minichromosome using telomere-associated chromosome fragmentation EMBO J. 14, 5444-5454 1995; Heller y cols., Minichromosomes derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93, 7125-7130, 1996). Los alfa-satélites de ADN son una clase de secuencias que se repiten de aproximadamente 170 pb de pares de nucleótidos encontrados en los centrómeros.

#### Descripción de la construcción del ADN episomal

El procedimiento de producción de vectores según los puntos previamente mencionados, comprende la separación de una región de plásmidos u otras secuencias de ácido nucleico y la inserción o ligación en un vector plasmídico por enzimas de restricción. En mayor detalle, el procedimiento comprende la sustitución de una o más secuencias que codifican los factores de replicación en un vector original con al menos una región S/MAR aislada y

caracterizada como se divulga en el párrafo 23. Esta operación puede realizarse usando técnicas de biología molecular convencionales, proporcionando la escisión de dichas regiones originales usando enzima de restricción, y la inserción de los fragmentos S/MAR en el vector.

- 5 Todos los elementos genéticos anteriormente descritos pueden insertarse en el vector episomal según los procedimientos de biología molecular ampliamente conocidos por aquellos expertos en la técnica (Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York).

10 Descripción del procedimiento de "transferencia génica mediada por espermatozoides" (SMGT)

Una vez que el vector episomal, como se describe anteriormente, se hace disponible, es necesario preparar de forma óptima las células germinales masculinas para que puedan recibir y transmitir de forma eficaz dicho vector.

- 15 Las células germinales masculinas pueden recogerse durante cualquier momento de su maduración empezando por el espermatogonio.

Preferentemente, el procedimiento usado según la presente invención generalmente comprende una primera etapa de recoger las células espermáticas y una segunda etapa de selección de las células espermáticas sobre la base del porcentaje de células provistas de motilidad con respecto a las células totales recogidas. De hecho, el procedimiento de SMGT se basa en la optimización de dos grupos de parámetros, representados por la calidad de la muestra de esperma y la capacidad de incorporar el ADN (incorporación de ADN). En particular, las células espermáticas se seleccionan adecuadamente tal como para mostrar un porcentaje de motilidad, después de tomarse del individuo, de al menos el 70% y de no menos del 65% después de lavar para eliminar el fluido espermático.

25 Calidad de la muestra

La calidad de la muestra se ha evaluado usando parámetros estandarizados para la evaluación de esperma de verraco tal como el volumen sin masa gelatinosa (>100 ml), la concentración (>1<sup>10</sup> espermatozoides/ml), la presencia de cualesquiera células espermáticas anómalas (<20%) y la motilidad en el momento de la recogida (>65%). Particularmente, el porcentaje de motilidad se ha evaluado según el procedimiento descrito por Lavitrano y cols., Mol. Repr and Develop. 64: 284-291, 2003 (Evaluation of Semen Quality).

Preferentemente, las células espermáticas se han recogido y separado descartando la primera fracción eyaculada, con contenido bajo en espermatozoides, y recogiendo más o menos el 30-40% inicial de la segunda fracción eyaculada, más rica en espermatozoides pero con contenido bajo en fluido seminal. Además, el eyaculado seleccionado ventajosamente puede recogerse y mantenerse a una temperatura de 37°C en contenedores estériles previamente calentados.

40 Capacidad de unión e incorporación de ADN

La fracción recogida se trata después tal como para completar la eliminación del fluido seminal. Particularmente, dicha etapa de eliminación puede tener lugar por al menos una etapa de lavado usando un líquido adecuado, preferentemente precedida por una etapa de eliminación de la porción gelatinosa del eyaculado realizada, por ejemplo, pasando a través de una gasa estéril.

Preferentemente, la eliminación del líquido seminal comprende las siguientes etapas en secuencia:

- 50 a) poner la muestra de eyaculado en contacto con un medio de lavado adecuado, para diluir la muestra;
- b) separar dicha muestra del medio de lavado;
- c) poner de nuevo en contacto dicha muestra con dicho medio de lavado;
- 55 d) separar otra vez la muestra del medio de lavado.

Después de la etapa a) la muestra diluida puede incubarse ventajosamente durante varios minutos, por ejemplo de 3 a 10 minutos, preferentemente 5 minutos, para promover la acción del medio de lavado.

60 La etapa de separación b) puede realizarse de cualquier manera conocida en la técnica, preferentemente por centrifugación. La centrifugación puede llevarse a cabo por ejemplo a desde 400 g hasta 1000 g, preferentemente a 800 g, a una temperatura de entre 16° y 38°C, preferentemente a 25°C durante un periodo de tiempo de entre 3 minutos y 20 minutos, preferentemente 10 minutos.

65 Una vez que el sobrenadante de la etapa b) se ha eliminado, las células espermáticas sedimentadas se resuspenden en el así llamado medio de lavado y puede llevarse a cabo la etapa d) de separación en las mismas

condiciones descritas para la etapa b). Preferentemente, la centrifugación se lleva a cabo a una temperatura de 17°C.

5 Particularmente, el medio de lavado puede ser una composición acuosa que comprende glucosa, a una concentración de entre 56 y 69 mM, citrato de sodio a una concentración de entre 31 y 37 mM, EDTA a una concentración de entre 11 y 14 mM, ácido cítrico a una concentración de entre 14 y 17 mM y base Trizma a una concentración de entre 48 y 59 mM. La osmolaridad final del medio debería estar típicamente entre 200 y 320 mOs, mientras que el pH se ajusta usando por ejemplo HCl, de 6,6 a 7,5, preferentemente 6,8.

10 Preferentemente, el medio de lavado anteriormente mencionado puede esterilizarse, por ejemplo, en un autoclave o por medio de microfiltración, y se precalienta a una temperatura de 37°C antes de su uso.

15 Debería apreciarse que, según una realización particularmente preferida, el medio de lavado está libre de calcio para evitar que esto promueva/estime ninguna actividad endonucleasa endógena y, como consecuencia, tenga un efecto perjudicial en el vector episomal.

Además, el medio de lavado puede incluir BSA a una concentración de entre 1 g/l y 30 g/l o cualquier otra fuente de proteína adecuada para la supervivencia de las células espermáticas.

20 Como se divulga anteriormente, el pH del medio se ajusta a un valor comprendido entre 6,6 y 7,5. Preferentemente, el pH es de 6,8 porque se ha observado un aumento significativo de la incorporación de ADN con dicho valor de pH.

#### Procedimiento para la captación del vector episomal en las células espermáticas (incorporación de ADN)

25 Una vez que el vector episomal y las células espermáticas se han proporcionado según los puntos anteriormente descritos, la etapa siguiente consiste en poner en contacto el vector con las células espermáticas, para que el vector se una a las células y opcionalmente entre en el núcleo de dichas células o, en otras palabras, tenga lugar la transfección de las células espermáticas con el vector episomal.

30 Se ha observado que para obtener la mejor "internalización" del vector, se incuban al menos  $1 \times 10^6$ /ml, preferentemente  $1 \times 10^9$  células espermáticas con de  $10^{-2}$  µg a 100 µg de vector episomal, preferentemente  $5 \mu\text{g}/10^8$  espermatozoides/ml. El tiempo de incubación generalmente está comprendido entre 30 minutos y 4 horas, y la temperatura puede variar de 17°C a 38°C.

35 Además, la adición del vector debería ocurrir preferentemente en un plazo de 60 minutos desde que se lavan las células espermáticas, más preferentemente en 30 minutos.

#### Procedimiento para la creación de animales modificados genéticamente

40 Como ya se ha mencionado en la introducción de esta memoria descriptiva, en este punto, las células espermáticas, transformadas según la invención, pueden usarse para fecundar un óvulo, y hacerlo de tal forma que el cigoto resultante se desarrolle en un individuo genéticamente modificado. El procedimiento comprende las siguientes etapas en secuencia:

45 i) poner en contacto una célula espermática, modificada según el procedimiento anteriormente descrito, con un óvulo para permitir su fecundación y

ii) mantener el cigoto resultante de la fecundación en condiciones tales que permitan el desarrollo del individuo.

50 La fecundación se realiza preferentemente por medio de técnicas de inseminación artificial in vivo ampliamente conocidas, tales como por ejemplo la técnica laparoscópica (Fantinati y cols., 2005).

55 Un sujeto adicional de la presente invención es un individuo genéticamente modificado no humano, cuyas células somáticas y germinales contienen un vector de expresión episomal estable, como se describe anteriormente. En particular, este individuo es un mamífero, preferentemente un cerdo.

Una realización de la invención, dada meramente a modo de ejemplo no limitante, se expone en lo sucesivo:

#### Materiales y procedimientos

##### Vectores plasmídicos

65 Los plásmidos usados en este estudio fueron pEPI-eGFP y el plásmido comercial pGFP-C1 (Clontech UK, Ltd.) del que se derivan los vectores pEPI. En las figuras 3 y 1, respectivamente, se da un mapa de ambos plásmidos, que muestra dónde difieren los dos plásmidos: pEPI-GFP contiene una S/MAR de 1,7 kb, aislada y caracterizada como se divulga en el párrafo 23, obtenida del gen del interferón β humano en el sitio de polienlace; pGFP-C1 contiene el

gen GFP, mientras que pEPI-eGFP tiene la versión potenciada del gen, eGFP, en la misma posición. Todas las demás secuencias de los dos plásmidos son idénticas. Los plásmidos se amplificaron en *Escherichia coli* NovaBlue (Novagen-Calbiochem).

## 5 Animales

Se recogió semen de un verraco blanco grande entrenado que había estado en abstinencia durante 3 días. Puercas blancas grandes receptoras prepuberales (99% 1,80 kg), fueron superovuladas y sincronizadas por una inyección intramuscular (im) de eCG (1250 IU) (Folligon® Intervet International B.V., Boxmeer, Países Bajos) seguida, 60 horas después, de hCG (750 IU). Se esperó la ovulación 40-44 h después del hCG. Se llevó a cabo la inseminación quirúrgica laparoscópica en la unión útero-tubárica (1 x 10<sup>9</sup> espermatozoides tratados con ADN/puerca) 36 horas después de la inyección de hCG como se describió anteriormente (Fantinati y cols., 2005). El cuidado de los animales y el procedimiento experimental cumplían las directrices locales, nacionales y de la Unión Europea.

## 15 Preparación del esperma

Se recogió semen y se preparó como se expone anteriormente (Lavitrano y cols., 2002; Lavitrano y cols., 2003) con modificaciones menores. Brevemente, inmediatamente después de la recolección, el semen se diluyó 1:1 con Medio de Fertilización Porcino (SFM) (11,25 g de glucosa, 10g de citrato de sodio (2H<sub>2</sub>O), 4,7 g de EDTA (2H<sub>2</sub>O), 3,25 g de ácido cítrico (H<sub>2</sub>O), 6,5 g de Trizma por litro, ajustado a pH 6,8) precalentado a 37°C. El fluido seminal se eliminó diluyendo de nuevo la suspensión de esperma 1:10 con SFM y centrifugando en tubos Falcon de 50 ml (Beckton y Dickinson, Milán, Italia) (800 x g durante 10 min). El procedimiento de lavado se repitió de nuevo con SFM suplementado con 6 g/l de Fracción V de BSA (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) (SFM/BSA) precalentado a 25°C. Se contaron las células espermáticas usando una cámara hemocitométrica y se resuspendieron a una dilución de trabajo de 1 x 10<sup>8</sup> células/ml en SFM/BSA a 25°C.

### Incorporación de ADN del esperma

Se tomó el esperma de un único cerdo entrenado previamente seleccionado en base a parámetros estándar usados en programas convencionales de cría de animales (volumen, concentración de esperma, presencia de células espermáticas anormales y motilidad) y en la capacidad de las células espermáticas para incorporar el ADN exógeno. La incorporación de ADN por el esperma se evaluó por experimentos de evolución temporal. Se realizó el recuento de centelleo líquido en células espermáticas eyaculadas lavadas (Lavitrano y cols., 2003) resuspendidas a una concentración de 1 x 10<sup>8</sup> células/ml SFM/BSA, mezcladas con 5 µg de ADN plasmídico de pEPI-eGFP y pGFP-C1 marcado por traducción de mella (Maniatis). Se realizaron experimentos de evolución temporal paralelos a diferentes temperaturas (17, 20, 25, 37°C). Se usaron cantidades crecientes de ADN (50, 100, 200, 400, 800 ng) para determinar las condiciones de incubación esperma-ADN más adecuadas. Se retiraron alícuotas que contenían 1 x 10<sup>6</sup> células espermáticas de la mezcla de incubación a tiempos específicos, se diluyeron en tubos Eppendorf que contenían 1 ml de SFM y se lavaron dos veces centrifugando a 1250 g durante 5 min en una microfuga.

40

### Incorporación esperma/ADN para SMGT e inseminación laparoscópica

Se incubaron células espermáticas lavadas durante 1 h a 17°C con vector pEPI-eGFP no linealizado (5 µg ADN/ml/10<sup>8</sup> espermatozoides). El tubo se invirtió cada 20 min para evitar la sedimentación del esperma. Los últimos 20 min de incubación fueron a TA con calefacción (37°C) durante 1 minuto antes de la inseminación laparoscópica (Fantinati y cols., 2005). Puercas sincronizadas se inseminaron laparoscópicamente con alícuotas de 5 ml por cuerno uterino, que contenían 5 x 10<sup>9</sup> espermatozoides tratados con ADN. Se realizó la recogida quirúrgica de los fetos con anestesia general después de 70 días de gestación. Se recogieron especímenes de diferentes órganos para su posterior análisis.

50

### Análisis por RT-PCR

Se extrajo el ARN total por kit Tissue (Versa-gene® RNA, Gentra). Del ARN total, 2 µg se sometieron a transcripción reversa usando SuperScript III (Invitrogen). El ADNc obtenido se amplificó con los siguientes cebadores (Sigma-Genosys), pEPI-1: 5' - CCT GAA GTT CAT CTG CAC CA - 3' (directo), 5' - TGC TCA GGT AGT GGT TGT CG - 3' (inverso). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Los experimentos de RT-PCR se sometieron a los controles rutinarios. Los cebadores usados amplificaron un fragmento de 480 kb. El riesgo de coamplificación de ADN genómico contaminante se eliminó llevando a cabo la reacción de PCR sin transcripción reversa anterior.

60

### Preparación de ADN y análisis de bandas de Southern

Se aisló ADN extracromosómico de un extracto HIRT (Piechaczek, 1999) preparado a partir de secciones de tejido y se analizó. Brevemente, se lisaron tejidos con 6 ml de una mezcla 1:1 de soluciones TEN (EDTA 1 mM / NaCl 150 mM / Tris HCl 10 mM, pH 7,5) y HIRT (SDS 1,2% / Tris HCl 20 mM, pH 7,5 / EDTA 20 mM). Veinte minutos después los tejidos se homogeneizaron con un homogeneizador de tipo dounce en hielo. Se añadieron 0,1 volúmenes de NaCl

65

5 M y los tejidos se incubaron durante toda una noche a +4°C. Se centrifugaron las muestras (30 min, +4°C, 6000 rpm) y se recuperaron los sobrenadantes. El ADN se purificó primero con fenol y después con soluciones de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24: 1) y de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó el ADN durante la noche a -20°C después de la adición de un volumen de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol. Se recuperó el ADN por centrifugación y se resuspendió en TE x 0,1 (TE: EDTA 1 mM / Tris HCl 10 mM, pH 7,5). Se fraccionó ADN extraído con HIRT (20 µl) tanto no digerido como digerido con Bgl II, en geles de agarosa al 0,7%, y se transfirió a membranas de nailon (Southern, 1975). El vector pEPI-eGFP se marcó con <sup>32</sup>P (kit de marcaje Ready-to-go, Amersham Pharmacia) y se usó como una sonda. Se llevó a cabo la hibridación en tampón Church (tampón fosfato de sodio 0,25 M, pH 7,2/EDTA 1 mM/BSA 1%/SDS 7%) a 65°C durante 16 horas. En estas condiciones estrictas, no se observó hibridación alguna en las muestras de ADN de fetos control.

#### Experimentos de rescate

La transformación de *E. coli* con ADN preparado por extracción de Hirt se realizó según HIRT B (1967, Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures, J. Mol. Biol.; 26 (2): 365-369). Las colonias transformadas se seleccionaron en placas de agarosa que contenían 30 µg/ml de kanamicina. El ADN se aisló de clones resistentes individuales y se sometió a análisis de restricción.

#### Microscopía confocal

Se fijaron biopsias de diferentes órganos con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) en solución salina tamponada con fosfato 0,01 M, pH 7,4 (PBS) a 4°C durante 2 horas, se lavaron minuciosamente con PBS, a 4°C durante toda una noche, después se incluyeron en una matriz de OCT (CellPath, Hemel Hempstead, Reino Unido) y se congelaron rápidamente en isopentano enfriado en hielo seco. Se cortaron secciones de criostato de 30 µm y se montaron en portaobjetos revestidos de gelatina de cromo-aluminio, se dejaron secar en una cámara enfriada libre de polvo, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con Vectashield (Vector Labs, Inc, EE.UU.) Los portaobjetos se analizaron con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskope 2 (Zeiss, Alemania), equipado con una cámara digital de alta resolución (C4742-95, Hamamatsu Photonics, Milán, Italia) y software HiPic (Hamamatsu Photonics, Alemania). Se obtuvieron imágenes de la expresión de la proteína fluorescente variante de GFP "*Aequorea Victoria*" (6083-1) usando el juego de filtros Zeiss 09 compuesto de un filtro de excitación BP 450-490, un divisor de haz FT 510 y un filtro de emisión LP 515 en el trayecto de la luz; la señal se codificó como verde. Las imágenes se ajustaron en brillo y contraste y se montaron como diapositivas usando Adobe PhotoShop (v. 6.0; Adobe Systems, San-Jose, CA). El análisis de la expresión se realizó con un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador (MCID 7.0; Imaging Res. Inc, Canadá). Para analizar la expresión de la proteína se midieron las señales de GFP como cuentas/área y como células positivas/área contada. Estos valores expresan respectivamente el número de puntos fluorescentes en relación con el área escaneada fijada y el porcentaje de células positivas. Los promedios se obtuvieron a partir de seis secciones seleccionadas al azar para cada muestra, y se hicieron comparaciones entre muestras modificadas genéticamente y controles. Todos los datos se exportaron y se convirtieron en un histograma de distribución de frecuencia usando el programa Sigma-Plot 8.0 (SPSS-Erkrath, Alemania). Se empleó una prueba t duplicada para comparar los animales modificados genéticamente y los controles. Se aceptó como significativa una diferencia cuando la probabilidad era menos que o igual al 5% (p<0,05). Todos los datos se expresan (señal/µm<sup>2</sup>) como promedios ± E.E.M. (P7: 145 ± 40; P11:180 ± 1 7; P13:120 ± 7), como se representa en la figura 8.

#### Resultados

Selección de Donante y Captación de ADN por el Esperma. La selección del donante de esperma y la optimización de la captación de ADN son las etapas clave en los exitosos resultados de la SMGT (Lavitrano y cols., 2003). Se usaron verracos Grandes Blancos como donantes de esperma. La calidad del semen se evaluó por procedimientos estándar usados en programas convencionales de cría de animales (véanse Procedimientos) y la incorporación de ADN se evaluó por recuento de centelleo líquido en experimentos de evolución temporal usando plásmidos pEPI-eGFP y pGFP-C1 marcados adecuadamente. Las figuras 4A y 4B muestran una evolución temporal de la captación de plásmidos circulares pEPI-eGFP (figura 4A) y pGFP-C1 (figura 4B) traducidos por traducción de la mella por células espermáticas de cerdo eyaculadas. La cinética de la captación de los dos plásmidos fue similar. En ambos casos hay unión rápida de la mayor parte del ADN durante los 15-30 min iniciales, seguida 60 min después por una meseta. Se realizaron experimentos de evolución temporal paralelos a diferentes concentraciones de ADN y temperaturas para determinar las mejores condiciones de incubación de ADN para las células espermáticas del verraco seleccionado (datos no mostrados). Los resultados obtenidos sugirieron que las condiciones óptimas eran una concentración de ADN de 5 µg de ADN plasmídico para 10<sup>8</sup> espermatozoides por ml a 17°C durante 1 h. Las células espermáticas del verraco seleccionado se usaron como vectores para transferir el vector vírico no episomal pEPI-eGFP a óvulos por inseminación laparoscópica (Fantinati y c., Theriogenology, 2005). Se recogieron dieciocho fetos de dos puercas (8 y 10 fetos, respectivamente) después de 70 días de gestación (más de 2/3 del periodo de gestación) cuando la organogénesis estaba totalmente completa. Se produjeron 5 fetos adicionales por una fecundación realizada con esperma que no había sido incubado con ADN exógeno (controles negativos). Se recuperaron secciones de tejido de riñón, hígado, corazón, pulmón y músculo de fetos obtenidos a partir de todas las tres fecundaciones y se estudiaron para la presencia y la expresión del transgén comunicador. El vector pEPI-eGFP

se expresa en tejidos de cerdos genéticamente modificados. La expresión del gen comunicador eGFP se evaluó por análisis de RT-PCR. El ARN total se preparó a partir de varios tejidos de todos los 18 animales y se ensayó para evaluar la presencia del transcrito eGFP. Las figuras 5A y 5B representan ejemplos de un análisis tal de RT-PCR usando ARN de hígado (figura 5A) y músculo y corazón (figura 5B) de los fetos P6, P7, P8, P11, P13, P9 (figura 5A) y P14, P15, P16, P17, P18 (figura 5B). En la figura 5, el símbolo M indica el marcador de peso molecular, los símbolos RT+ o RT- indican que la reacción de amplificación se ha llevado a cabo sobre una plantilla previamente obtenida en la reacción de retrotranscripción respectivamente en presencia o ausencia de enzima retrotranscriptasa, C indica control negativo, es decir tejido animal no modificado genéticamente. Los cebadores usados se derivaron del gen eGFP y amplificaron un fragmento de 480 pb. En ningún caso se amplificó un producto de PCR usando ARN de tejido control de fetos (figura 5A, carril 1, 2; figura 5B, carril 1, 2). El transcrito de eGFP estaba presente en al menos un tejido ensayado en 9 de cada 20 fetos ensayados. En un feto la presencia de este transcrito pudo demostrarse en todos los tejidos analizados, mientras que en los demás fetos el transcrito estaba presente en promedio en entre 1 de cada 4 y 3 de cada 4 de los tejidos ensayados. El transcrito de eGFP estaba presente en el 50% de todos lo hígados ensayados, en aproximadamente el 27% de los músculos, en el 27% de los corazones y en el 16% de los riñones ensayados.

La expresión de la proteína eFGP se analizó por microscopía confocal en tejido muscular de 8 fetos (P6-P13) que se suponían genéticamente modificados y de los fetos control. La expresión de eGFP pudo demostrarse en 5 (P7, P8, P11, P13 y P6) de cada 8 fetos ensayados. La expresión de la proteína eGFP pudo mostrarse en todos los 5 fetos que habían dado positivo en la prueba para la presencia del transcrito eGFP, como se demostró por RT-PCR, mientras que no se hubo encontrado nada de transcrito eGFP previamente en los otros tres fetos. Se eligieron tres fetos positivos para la expresión de proteína eGFP y tres fetos control para la evaluación cuantitativa de la expresión de eGFP. El análisis histológico de tejidos musculares de los diferentes animales mostró fibras de apariencia normal (figura 6A). La expresión de la proteína eGFP pudo verse en entre el 62% y el 83% de las células (figuras 6b-6D). El análisis de emisión de fluorescencia reveló una expresión discreta de una proteínas fluorescente en las fibras, que se mostraba como puntos de fluorescencia intensa discretos (figuras 6B y 6D). El nivel de expresión de proteína no fue idéntico en todos los fetos, aunque estaba en el mismo intervalo de valores, entre aproximadamente 117 y 179 puntos fluorescentes por área (figura 6E). No pudieron detectarse puntos fluorescentes en el tejido muscular de fetos control (figura 4A).

El vector pEPI se mantiene en el estado episomal. Para determinar si el vector no vírico usado para modificar genéticamente cerdos por SMGT se retuvo en los fetos como epitoma, se extrajo ADN por el procedimiento Hirt (Hirt, 1967) de tejidos de hígado (P11, P15), músculo (P14) y riñón (P15) de tres fetos. Las muestras de ADN, bien no digeridas o bien digeridas con BgIII, se fraccionaron en geles de agarosa, se sometieron a prueba de bandas de Southern y se hibridaron, usando el plásmido entero como sonda. Las bandas de ADN se observaron en todas las muestras ensayadas y el patrón de ADN fue siempre idéntico: en muestras de ADN no digerido se observaron dos bandas diferentes, correspondientes respectivamente a las formas círculo abierto, lineal y superenrollada del vector (figura 7A); en muestras de ADN digerido con Bgl II se encontró una banda, que correspondía a la forma linealizada del plásmido. En la figura 7A, el símbolo M indica marcador de peso molecular; el símbolo P indica plásmido digerido con BgIII; los números 1 y 2 corresponden a análisis de ADN extraído con Hirt a partir del hígado de la muestra P11 respectivamente linealizado (1) y no digerido (2); los números 3 y 4 corresponden al análisis de ADN extraído con Hirt a partir de músculo de la muestra P14 respectivamente linealizado (3) y no digerido (4); los números 5 y 6 corresponden al análisis de ADN extraído con Hirt a partir del riñón de la muestra P14, respectivamente linealizado (5) y no digerido (6); los números 7 y 8 corresponden al análisis de ADN extraído con Hirt a partir del hígado de la muestra P15, respectivamente linealizado (7) y no digerido (8). La intensidad de estas bandas era muy débil y comparándola con la hibridación de ADN de vector aislado a diferentes concentraciones, se estimó que el número de copias del vector presentes en las células transfectadas debe estar por debajo de 20 copias por célula (datos no mostrados), un número observado para varias líneas celulares transfectadas con este vector (Piechaczek, Schaarschmidt, Athanassiou). En ningún caso se observó la hibridación con ADN genómico de elevado peso molecular. Los análisis de ADN extraído por Hirt sugirieron que el plásmido pEPI-eGFP estaba presente en la fracción de ADN extracromosómico. El estado episomal se confirmó adicionalmente por experimentos de rescate en los que *E. coli* se transformó con ADN aislado a partir de un extracto de Hirt de estos tejidos. Se obtuvieron colonias de bacterias resistentes a kanamicina a partir de muestras de hígado (P11, P15) y músculo (P14) aunque, debido al número bajo de copias del vector, se obtuvieron sólo muy pocas (entre 3 y 10) colonias en estos experimentos de rescate. El ADN plasmídico extraído de estos clones se digirió con BGI II o con BgIII y EcoRI (digestión enzimática doble) y se analizó en geles de agarosa. En todos los casos los patrones de restricción fueron idénticos a los observados en la digestión del plásmido pEPI-eGFP (figura 7B). En la figura 7B, el símbolo M indica marcador de peso molecular, los números 1 y 2 indican respectivamente pEPI-eGFP linealizado con BgIII o digerido con BgIII y EcoRI; los números 3 y 4 indican respectivamente ADN plasmídico extraído de colonias obtenidas a partir de hígado de la muestra P11, respectivamente linealizado con BgIII o digerido con BgIII y EcoRI.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para la transferencia de secuencias de nucleótidos y/o genes exógenos a células animales que comprende las siguientes etapas en secuencia:
- proporcionar un vector replicante episomalmente estable que comprenda al menos una región de unión a la estructura/matriz nuclear (S/MAR) y al menos un origen de replicación (ORI) vírico, procariota y/o eucariota y al menos una secuencia de nucleótidos y/o secuencia génica de interés que debe transferirse en y expresarse en el huésped;
  - 10 - proporcionar células germinales masculinas no humanas vivas;
  - 15 incubar dichas células germinales masculinas vivas tratadas con dicho vector episomal tal como para permitir la unión del vector con las células y opcionalmente su entrada al núcleo de las células germinales masculinas.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las regiones S/MAR son de origen mamífero, preferentemente humano, y tienen una longitud mínima de 800 pb.
- 20 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la región S/MAR se selecciona entre la región 5' del gen del interferón  $\beta$  humano, aislada como un fragmento EcoRI/BglII de 2,0 kb a partir del plásmido pTZ-E20 o como un fragmento S/MAR 1,7 obtenido en el sitio de polienlace.
- 25 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que dicho origen se selecciona entre EBV-ORI, BPV-ORI y SV40-ORI.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el vector es un vector de expresión.
- 30 6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el vector comprende adicionalmente uno o más de los siguientes elementos génicos:
- un promotor, un operador, un terminador y secuencias de sitios de unión a ribosomas.
- 35 7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vector está, además, libre de cualesquiera secuencias nucleotídicas que codifiquen cualesquiera proteínas víricas, sobre todo si actúa en trans.
- 40 8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el vector comprende adicionalmente uno o más genes de resistencia a antibióticos.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el vector comprende adicionalmente promotores o potenciadores constitutivos, específicos de ciclo celular, específicos de tejido, metabólicamente regulados o inducibles.
- 45 10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el gen de interés llevado por el vector es un gen que codifica una proteína de interés terapéutico.
- 50 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el vector está asociado con vectores de transfección.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el vector está incluido en un vehículo liposomal.
- 55 13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que el vector está unido al vehículo por medio de proteínas de unión a ácidos nucleicos.
14. El procedimiento según las reivindicaciones 12 ó 13, en el que el vehículo comprende polipéptidos que contienen histidina para incrementar la facilidad de entrada en la célula huésped.
- 60 15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el vector es el plásmido circular pEPI-1 o se selecciona entre sus derivados que comprenden pEPI-RSV, pDiMAR, pTetMAR y pMARS.
- 65 16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la etapa de proporcionar células germinales masculinas comprende la selección de células espermáticas, que tengan un porcentaje de motilidad total, de al menos el 70% en el momento de la recogida y la subsiguiente eliminación del fluido

seminal para mantener un porcentaje de motilidad no inferior al 65%.

5 **17.** El procedimiento según la reivindicación 16, en el que la selección de las células espermáticas comprende una primera etapa de recogida de las células espermáticas del eyaculado y una segunda etapa de identificación del porcentaje de motilidad de dichas células espermáticas.

10 **18.** El procedimiento según la reivindicación 17 en el que la etapa de recogida comprende la recolección del 30-40% de la segunda fracción de eyaculado en contenedores estériles, precalentados a una temperatura de 37°C.

15 **19.** El procedimiento según las reivindicaciones 16, 17 ó 18, en el que la etapa de eliminación del fluido seminal comprende:

a) poner la muestra de eyaculado en contacto con un medio de lavado adecuado, tal como para diluir dicha muestra;

b) separar dicha muestra del medio de lavado;

20 c) poner de nuevo en contacto dicha muestra con dicho medio de lavado;

d) separar de nuevo la muestra del medio de lavado.

25 **20.** El procedimiento según la reivindicación 18, en el que después de la etapa a) la muestra diluida se incuba durante 3-10 minutos.

30 **21.** El procedimiento según las reivindicaciones 19 ó 20, en el que la etapa b) se realiza por centrifugación a una velocidad de entre 400 g y 1000 g, a una temperatura de entre 16° y 38°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 3 minutos y 20 minutos.

35 **22.** El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, en el que el medio de lavado es una composición que comprende glucosa, a una concentración de entre 56 y 69 mM, citrato de sodio a una concentración de entre 31 y 37 mM, EDTA a una concentración de entre 11 y 14 mM, ácido cítrico a una concentración de entre 14 y 17 mM y base Trizma a una concentración de entre 48 y 59 mM, siendo típicamente la osmolaridad final de entre 200 y 320 mOs y ajustándose el pH de 6,6 a 7,5.

40 **23.** El procedimiento según la reivindicación 22, en el que el medio de lavado se esteriliza y se precalienta antes de su uso.

**24.** El procedimiento según las reivindicaciones 22 ó 23, en el que el medio de lavado está libre de calcio.

45 **25.** El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 en el que el medio de lavado comprende adicionalmente una fuente de proteína, a una concentración de entre 1 g/l y 30 g/l.

**26.** El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en el que el pH del medio de lavado se ajusta a un valor de 6,8.

50 **27.** Un procedimiento para la incorporación de un vector plasmídico episomal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en células espermáticas no humanas que se han tratado según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 26, que comprende poner dicho vector en contacto con dichas células en un medio adecuado.

55 **28.** El procedimiento según la reivindicación 27, en el que al menos  $1 \times 10^6$  células espermáticas/ml se incuban con de  $10^{-2}$  µg a 100 µg de vector episomal en un medio según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, a una temperatura de entre 17° y 38°C durante un periodo de tiempo de entre 30 minutos y 4 horas.

**29.** Un individuo genéticamente modificado no humano, cuyas células germinales y somáticas contienen un vector de expresión episomal estable, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

60 **30.** Un individuo genéticamente modificado no humano según la reivindicación 29 que es un mamífero.

**31.** Un individuo genéticamente modificado no humano según la reivindicación 30 que es un cerdo.

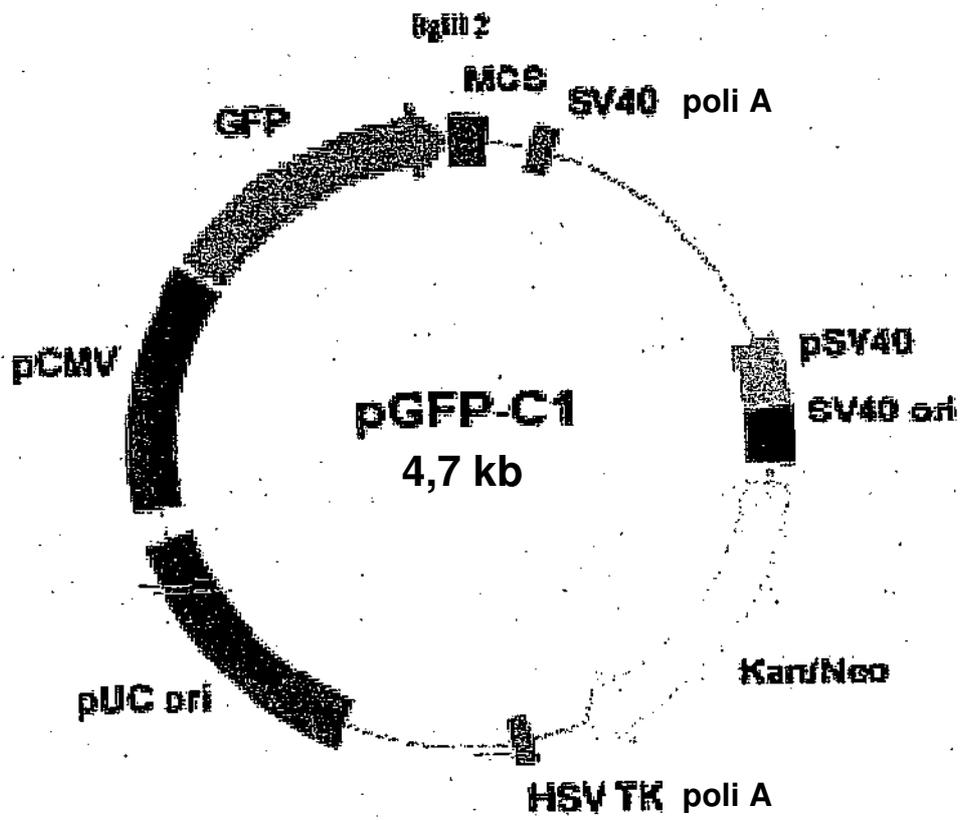


FIG.1

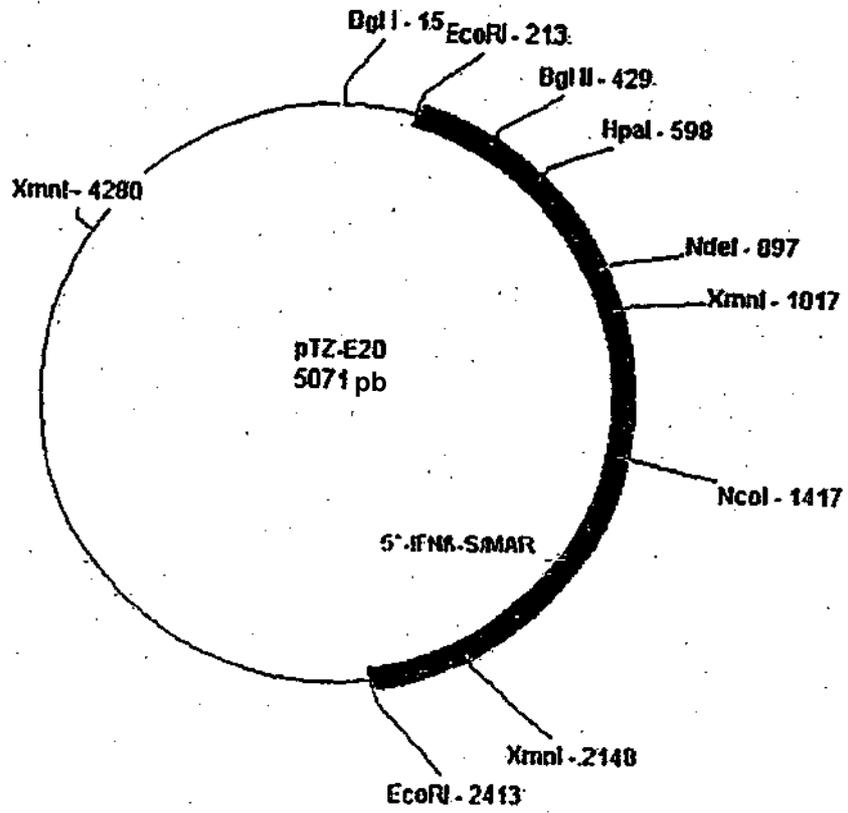


FIG.2

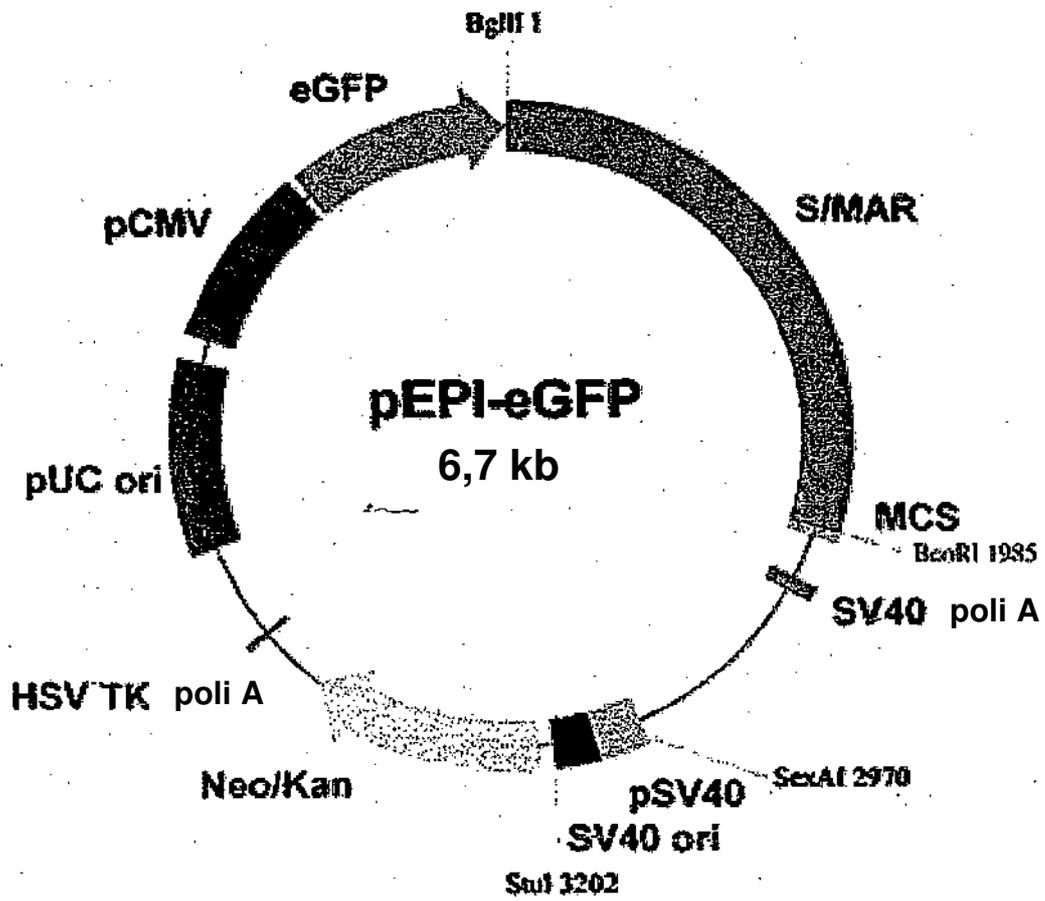


FIG. 3

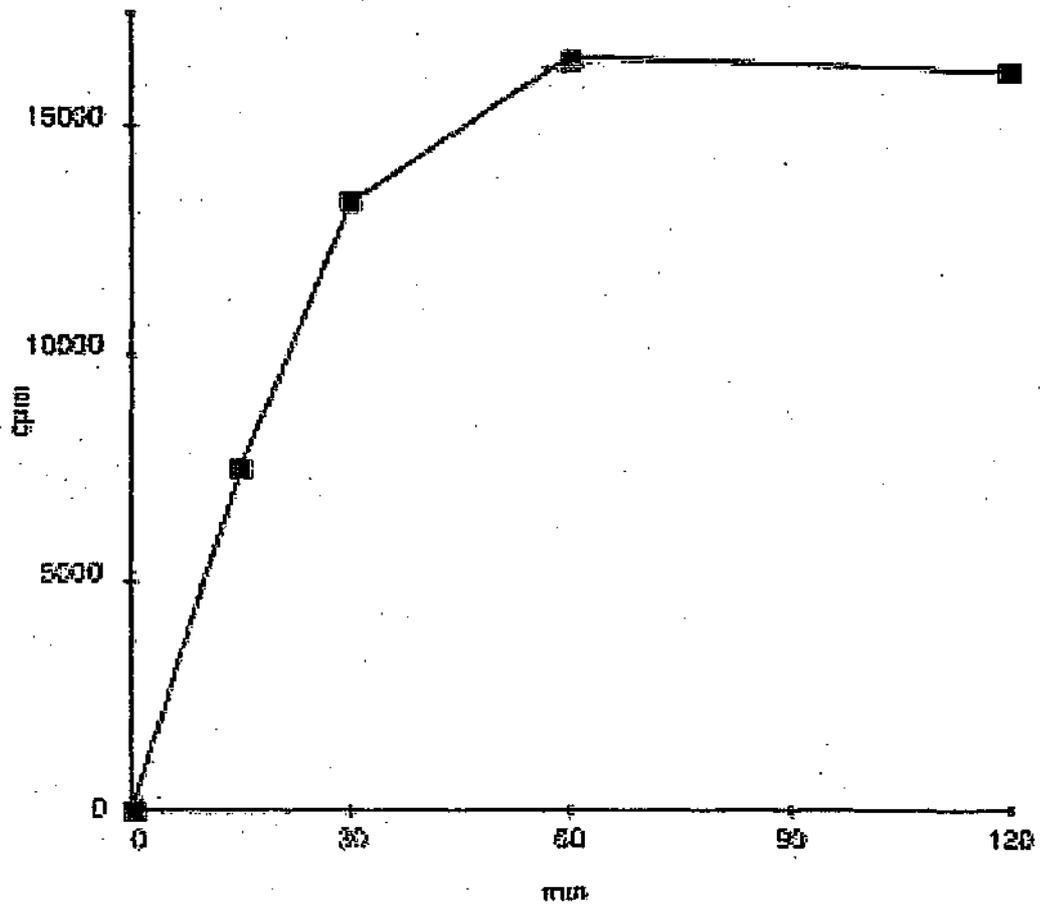


FIG. 4A

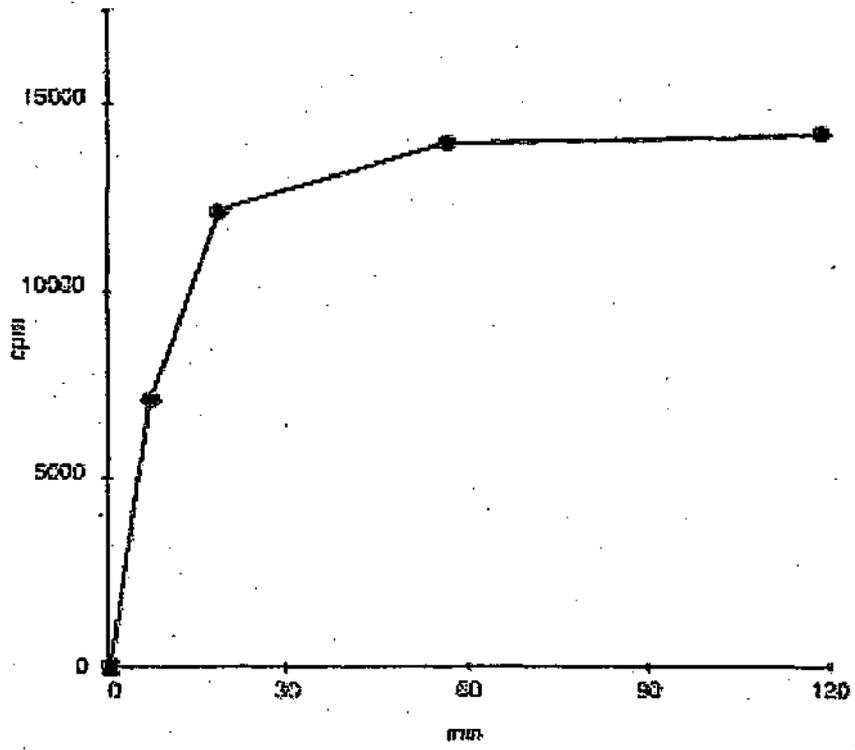


FIG. 4B

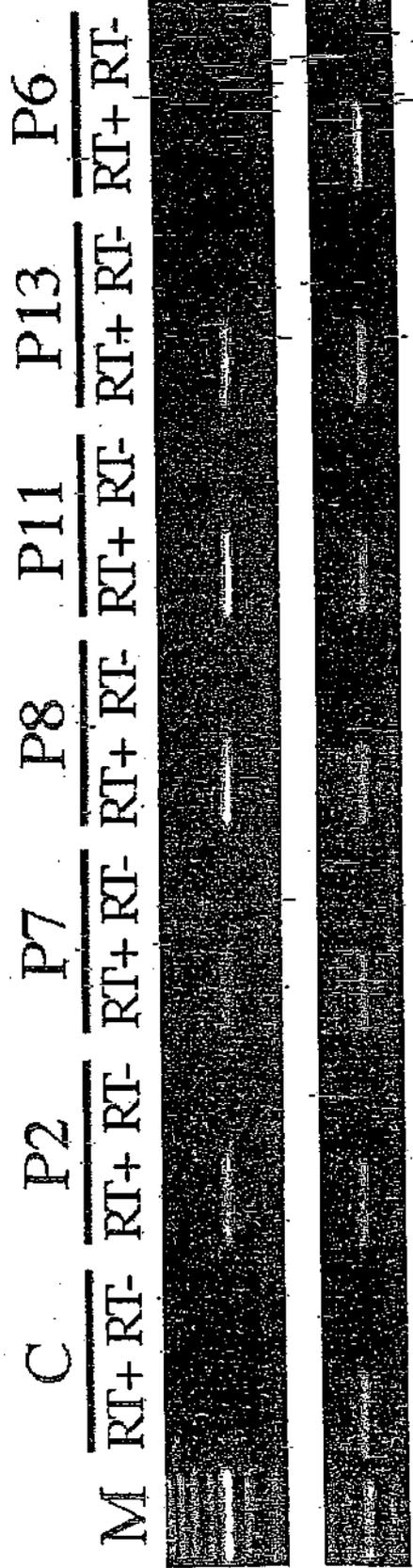


FIG. 5A

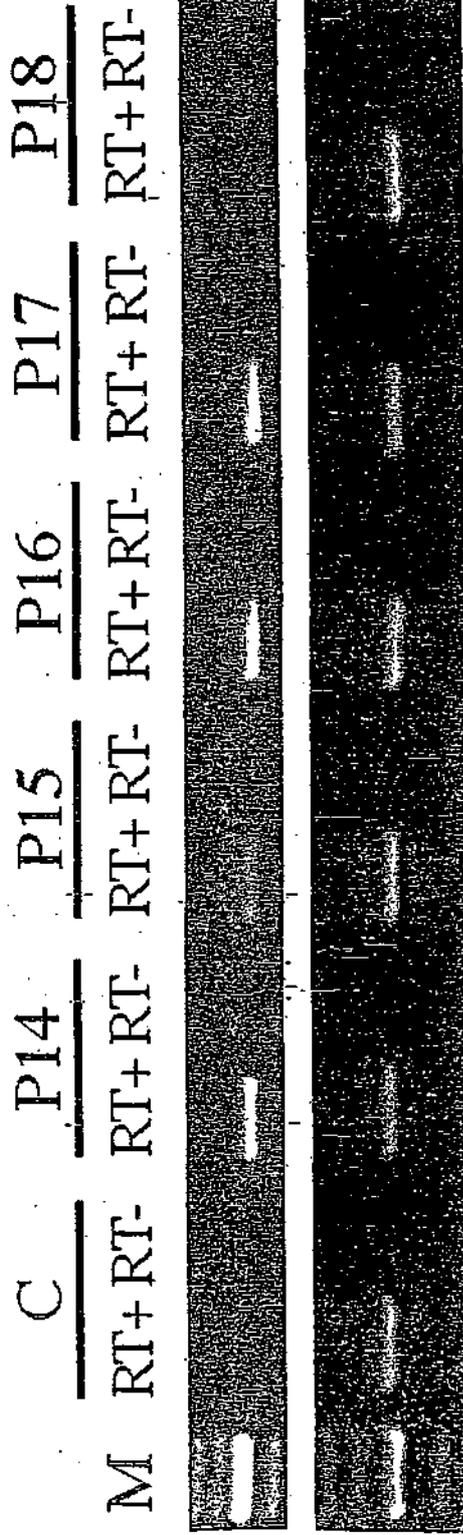


FIG. 5B

FIG. 6B



FIG. 6D



FIG. 6A



FIG. 6C



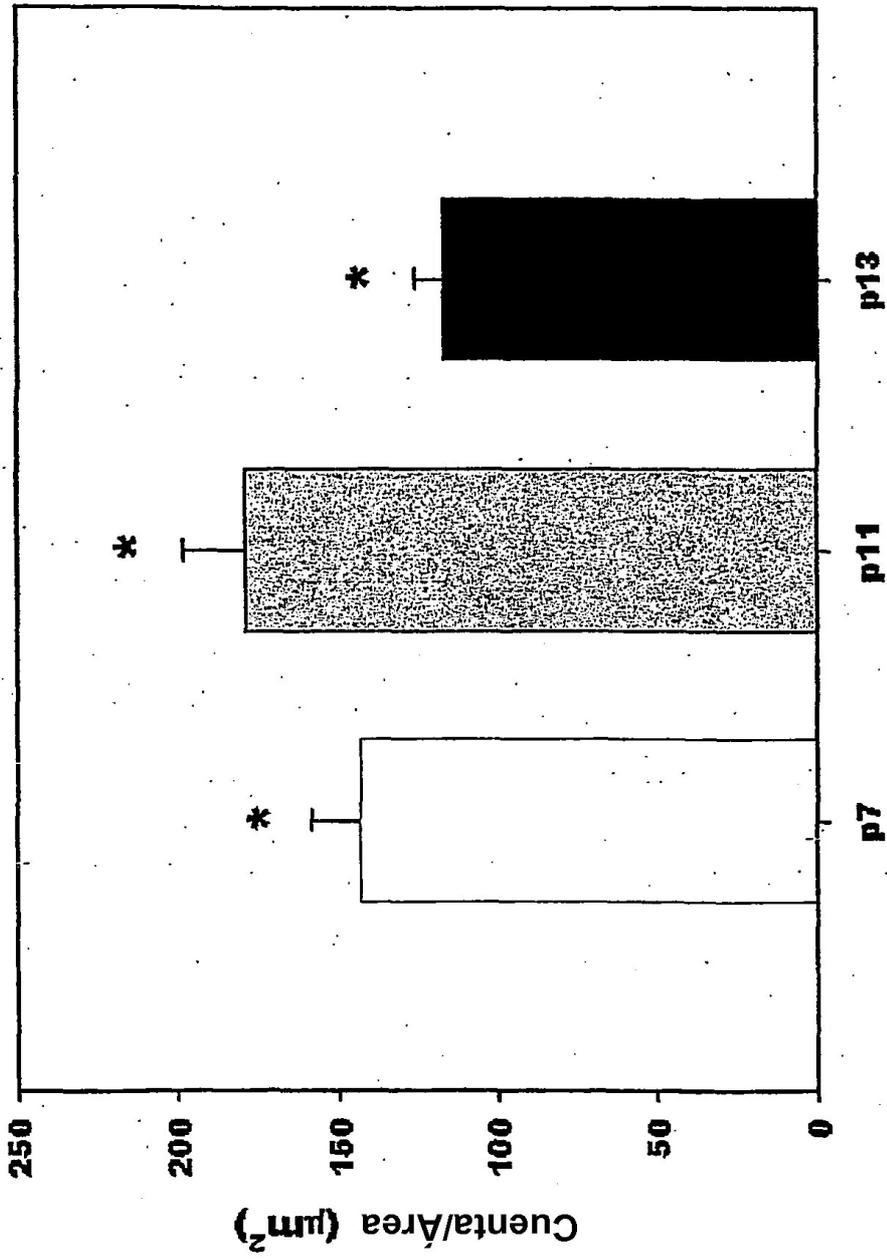


FIG.6E

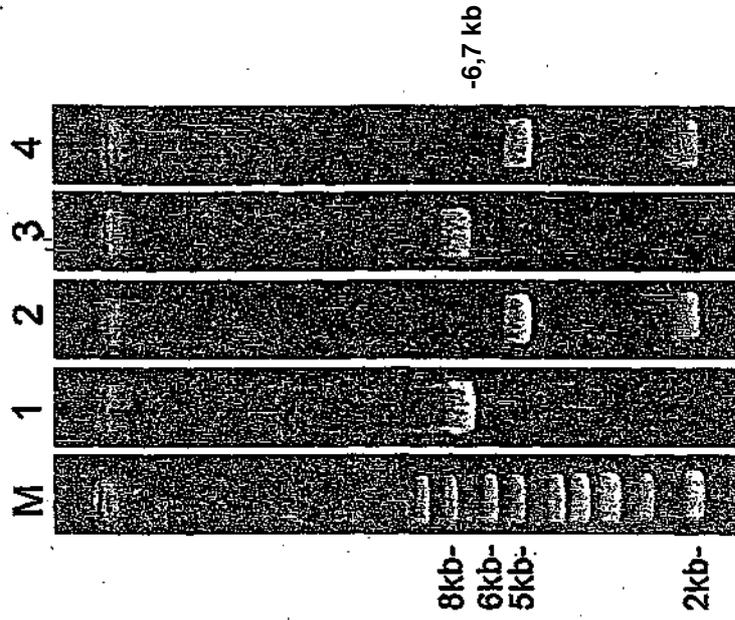


FIG.7B

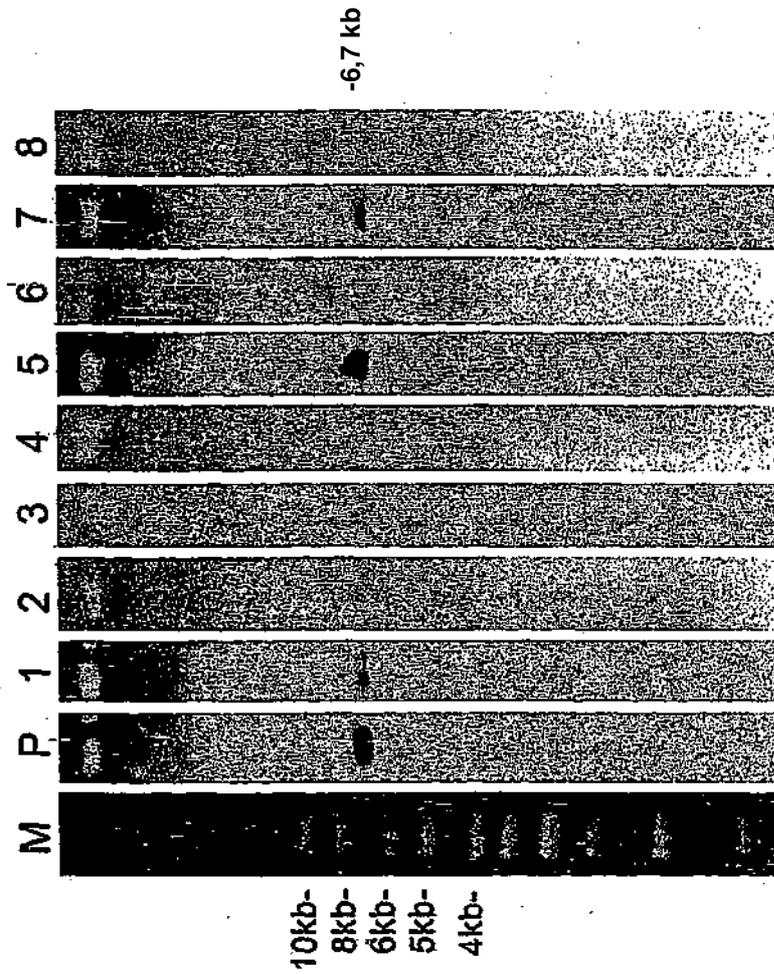


FIG.7A