

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 476**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2005 E 05807480 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1802193**

54 Título: **Método para generar un ratón homocigótico para una modificación genética**

30 Prioridad:

19.10.2004 US 619999 P

10.06.2005 US 689192 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.05.2014

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 OLD SAW MILL RIVER ROAD

TARRYTOWN, NY 10591-6707, US

72 Inventor/es:

POUEYMIROU, WILLIAM;

DECHIARA, THOMAS M.;

AUERBACH, WOJTEK;

FRENDEWEY, DAVID y

VALENZUELA, DAVID M.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 463 476 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

Método para generar un ratón homocigótico para una modificación genética

5 **Antecedentes**

Campo de la invención

10 La invención se dirige a métodos mejorados para generar un ratón homocigótico o heterocigótico para una modificación genética. Más específicamente, la presente invención se dirige a métodos para aumentar la eficiencia de generación de ratones capaces de transmitir una modificación deseada a su descendencia posterior, para generar ratones que tienen una alta contribución de material genético de células donantes, y para aumentar la eficiencia y disminuir el tiempo necesario para generar ratones homocigóticos o heterocigóticos que porten la modificación genética deseada.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Se conocen en la técnica métodos para modificar células donantes eucarióticas. Véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos N° 6.586.251. También se conocen en la técnica métodos para generar animales transgénicos. En Yagi et al. (1993) Analytical Biochemistry 214: 70-76 se describe un método propuesto para mejorar la eficiencia en la generación de animales capaces de transmitir una modificación deseada en células ES TT2.

Breve resumen de la invención

25 La invención se refiere exclusivamente a la modificación genética de ratones. La invención se basa en parte en la realización de que la introducción de una célula modificada en un embrión huésped en estadio temprano aumenta sustancialmente el material genético y la contribución celular de las células donantes al embrión huésped, de tal forma que el animal producido tiene una fracción incrementada de células del donante y por tanto tienen una probabilidad aumentada de transmitir la modificación a través de la línea germinal. Además, los métodos de la invención permiten emplear un intervalo más amplio de células donantes de lo que se practicaba con los métodos de la técnica anterior. Los métodos de la presente invención por tanto reducen el número de animales y cruzamientos necesarios para generar un animal homocigótico para una modificación.

35 La presente invención proporciona un método para generar un embrión de ratón que comprende células que son homocigóticas para una modificación genética, que comprende:

- (a) introducir células donantes de ratón en un embrión huésped de ratón en pre-mórula, en donde las células donantes son células ES o células tipo ES procedentes de un ratón endogámico, y que son homocigóticas para la mutación genética; y
- 40 (b) cultivar el embrión huésped en pre-mórula de (a) hasta el estadio de blastocisto.

en donde al menos un 90 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.

45 El método anterior de la invención puede comprender además introducir el embrión de (b) en una madre ratón subrogada para la gestación.

La presente invención también proporciona un método para generar un embrión de ratón que comprende células que son heterocigóticas para una modificación genética, que comprende:

- 50 (a) introducir células donantes de ratón en un embrión huésped de ratón en pre-mórula, en donde las células donantes de ratón son células ES o células tipo ES procedentes de un ratón endogámico, y que son heterocigóticas para la modificación genética; y
- (b) cultivar el embrión huésped en pre-mórula de (a) hasta el estadio de blastocisto,

55 en donde al menos el 90 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.

60 El método anterior de la invención puede comprender además gestar el embrión de (b) en una madre ratón subrogada.

La presente invención además proporciona un embrión de ratón en pre-mórula que comprende células donantes de ratón introducidas bajo la zona pelúcida, en donde las células donantes comprenden células ES o células tipo ES procedentes de un ratón endogámico que son heterocigóticas u homocigóticas para una modificación genética.

65

Los métodos anteriores de la invención pueden además comprender la gestación del embrión de ratón modificado genéticamente para generar un embrión de ratón modificado genéticamente para generar un ratón modificado genéticamente. En los casos donde las células donantes son homocigóticas para la modificación genética, al menos un 90 % de las células en el ratón modificado genéticamente son homocigóticas para la modificación genética. En los casos donde las células donantes son heterocigóticas para la modificación genética, al menos un 90 % de las células en el ratón modificado genéticamente son heterocigóticas para la modificación genética.

Además se describe en el presente documento un método para generar un mamífero no humano modificado, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano; y (b) introducir el embrión de (a) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero no humano modificado.

El embrión en estadio temprano empleado en los métodos de la invención es un embrión en estadio pre-mórula. En una realización más específica, el embrión en estadio temprano es un embrión de 8 células. El embrión en estadio temprano puede derivarse de cualquier cepa. En una realización, se emplea un embrión endogámico, por ejemplo C57BL/6, como embrión huésped. En otra realización, se emplea un embrión exógamo, por ejemplo Swiss Webster, como embrión huésped.

La célula donante eucariótica es una célula madre. Más específicamente, la célula madre es una célula madre embrionaria (ES) o una célula de tipo ES. Pueden emplearse células ES de cualquier línea celular ES adecuadas en el método de la invención. En una realización, la célula ES se deriva de una cepa endogámica, por ejemplo, 129, C57BL/6 o BalbC. En otra realización, la célula ES se deriva de una cepa híbrida, por ejemplo, C57BL/6 x 129. En una realización específica, la célula es una célula ES de ratón. Los métodos descritos en el presente documento pueden practicarse con células derivadas de otros mamíferos no humanos, por ejemplo, una célula ES o tipo ES de rata. En una realización, la célula ES o tipo ES es una célula modificada que comprende una modificación genética. En una realización más específica, la modificación puede surgir espontáneamente, puede ser al azar, puede ser el resultado de una manipulación experimental, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno. Se puede introducir un ácido nucleico exógeno mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por recombinación homóloga.

Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para generar un mamífero no humano homocigótico para una modificación genética, que comprende: (a) introducir una célula femenina donante eucariótica en un embrión huésped en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica es heterocigótica para la modificación genética; (b) mantener al embrión de (a) en cultivo para desarrollo posterior; (c) introducir al embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero hembra modificado; (a') introducir una célula masculina donante eucariótica en un embrión huésped en estadio temprano, en donde la célula donante es heterocigótica para la modificación genética; (b') mantener al embrión de (a') en cultivo para desarrollo posterior; (c') introducir el embrión de (b') en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero macho modificado; y (d) cruzar al macho y hembra sexualmente maduros de (c y c'), en donde se genera un mamífero no humano homocigótico para la modificación genética.

En una realización, la célula femenina donante eucariótica de la etapa (a) se deriva de la misma línea celular que la célula masculina donante eucariótica de la etapa (a'). En una realización más específica, la célula femenina donante eucariótica de la etapa (a) es una célula XO y el mamífero hembra modificado de la etapa (c) es un ratón XO.

La célula donante eucariótica masculina o femenina es una célula madre, preferentemente una célula ES o tipo ES heterocigótica. En una realización, la célula ES heterocigótica se genera mediante (i) la obtención de un fragmento genómico elongado clonado que contiene una secuencia de interés de ADN; (ii) el uso de recombinación homóloga bacteriana para modificar genéticamente el fragmento genómico elongado clonado de (i) para crear un vector de elongación orientado para usarlo en células eucarióticas donantes (LTVEC, o vector de elongación orientado); (iii) la introducción del LTVEC de (ii) en las células donantes eucarióticas para modificar un gen endógeno o locus cromosómico en las células donantes eucarióticas; y (iv) emplear un ensayo cuantitativo para detectar la modificación de alelos en las células donantes eucarióticas de (iii) para identificar a aquellas células donantes eucarióticas en las cuales el gen endógeno o locus cromosómico se ha modificado genéticamente.

En varias realizaciones, las condiciones de cultivo de la etapa (b) y/o (b') permiten al embrión desarrollarse hasta un estadio post-mórula o posterior. En una realización, las condiciones de cultivo de la etapa (b) y/o (b') se proporcionan con un medio de cultivo condicionado por un factor de crecimiento. En una realización preferida, el factor de crecimiento es una proteína de la familia de Wnt. En una realización, la proteína Wnt se añade directamente al medio de cultivo. En otra realización, la proteína Wnt se produce por células L de ratón. En otra realización más, el medio de cultivo comprende un factor inhibidor de leucemia (LIF).

En una realización específica, un embrión en estadio de blastocisto de (b) y/o (b') se introduce en una madre subrogada para la gestación y desarrollo posterior.

La célula donante eucariótica puede introducirse en un embrión en estadio temprano mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, la célula donante eucariótica se introduce bajo la zona pelúcida del

embrión en estadio temprano. Otras metodologías incluyen la retirada de la membrana de la zona pelúcida. En una realización más específica, la célula donante eucariótica puede introducirse bajo la zona pelúcida mediante inyección u otros métodos que creen una abertura en la zona pelúcida. En una realización específica, se genera una abertura en la zona pelúcida mediante un láser. En una realización, el láser comprende un diodo láser infrarrojo en estado sólido. En otra realización, la célula donante eucariótica se introduce en el embrión huésped mediante métodos de fusión celular.

En una realización, se cría en la etapa (d) un ratón modificado que comprende más del 90 % de células derivadas de las células donantes. En una realización preferida, el ratón modificado comprende más del 95 % de células derivadas de las células donantes. Más preferentemente, el ratón modificado comprende el 100 % de células derivadas de las donantes.

Además se describe en el presente documento un método para generar un embrión no humano homocigótico para una modificación genética, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica femenina en un embrión en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica femenina es heterocigótica para la modificación genética; (b) mantener al embrión de (a) en cultivo para desarrollo posterior; (c) introducir el embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero hembra modificado; (a') introducir una célula donante eucariótica masculina en un embrión huésped en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica masculina es heterocigótica para la modificación genética; (b') mantener el embrión de (a') en cultivo para desarrollo posterior; (c') introducir el embrión de (b') en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero macho modificado; y (d) cruzar al mamífero macho modificado con el mamífero hembra modificado de (c y c'), en donde se genera un embrión no humano homocigótico para la modificación genética.

La presente divulgación también se refiere a un método para generar un mamífero no humano homocigótico para una modificación genética, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica es homocigótica para la modificación genética; (b) mantener al embrión de (a) en cultivo para desarrollo posterior; (c) introducir el embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero no humano homocigótico para la modificación genética.

En una realización, el método para generar la célula donante eucariótica homocigótica para la modificación genética comprende una conversión génica, dirigiendo ambos alelos del mismo gen, o dirigiendo tanto un gen ligado a X- o a Y- en una célula ES masculina.

Además se divulga en el presente documento un método para generar un embrión no humano homocigótico para una modificación genética que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica es homocigótica para la modificación genética; y (b) cultivar el embrión en estadio temprano de la etapa (a), en donde se genera un embrión no humano homocigótico para la modificación genética.

Además se describe en el presente documento un método para aumentar la contribución relativa de material genético procedente de una célula donante eucariótica a un embrión huésped no humano, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano; y (b) cultivar el embrión en estadio temprano de la etapa (a) en condiciones que permiten al embrión desarrollarse hasta un estadio post-mórula o posterior.

En una realización, las condiciones de cultivo de la etapa (b) permiten al embrión desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. En otra realización, las condiciones de cultivo de la etapa (b) permiten al embrión desarrollarse hasta una gástrula o posterior. En varias realizaciones, las condiciones de cultivo de la etapa (b) permiten al embrión desarrollarse hasta un estadio post-mórula o posterior. En una realización, las condiciones de cultivo de la etapa (b) se proporcionan con un medio condicionado por un factor de crecimiento. En una realización preferida, el factor de crecimiento es una proteína de la familia de Wnt. En una realización, la proteína Wnt se añade al medio de cultivo directamente. En otra realización, la proteína Wnt se introduce por células L. En otra realización más, el medio de cultivo comprende además un factor inhibidor de leucemia (LIF).

Además en el presente documento se describe un método para generar un mamífero no humano que tiene una contribución relativa aumentada de material genético de una célula donante eucariótica a un embrión huésped, que comprende: (a) introducir una célula eucariótica donante en un embrión en estadio temprano; (b) cultivar el embrión en estadio temprano de la etapa (a) en condiciones que permiten al embrión desarrollarse a un estadio post-mórula o posterior; y (c) introducir el embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un mamífero no humano que tiene una fracción aumentada de células procedentes de la célula eucariótica donante.

También se describe en el presente documento un método para generar un mamífero no humano capaz de transmitir una modificación genética, que comprende: (a) introducir una célula donante eucariótica en un embrión en estadio temprano, en donde la célula donante eucariótica porta una modificación genética; (b) cultivar el embrión en estadio temprano de la etapa (a) en condiciones que permitan al embrión desarrollarse hasta un estadio post-mórula o posterior; y (c) introducir el embrión de (b) en una madre subrogada para la gestación, en donde se genera un

mamífero no humano capaz de transmitir la modificación genética.

Adicionalmente se divulga en el presente documento un ratón modificado genéticamente generado mediante un método de la invención. En una realización preferida, el 90 % o más de las células ratón son células derivadas de la célula donante; más preferentemente, el 95 % o más de las células del ratón son células derivadas de la célula donante; aún más preferentemente, el 99 % o más de las células son células derivadas de la célula donante. En una realización, el 100 % de las células del ratón son células derivadas de la célula donante.

También se divulga en el presente documento un embrión de ratón modificado genéticamente generado mediante un método de la invención. En una realización preferida, el 90 % o más de las células del embrión son células derivadas de la célula donante; más preferentemente, el 95 % o más de las células son células derivadas de la célula donante; aún más preferentemente, el 99 % o más de las células son células derivadas de la célula donante. En una realización, el 100 % de las células del embrión son células derivadas de la célula donante.

También se divulga en el presente documento un medio de cultivo para mantener y/o desarrollar un embrión en estadio temprano, en donde el medio de cultivo comprende un factor de crecimiento.

En una realización, el factor de crecimiento es una proteína de la familia de Wnt. La proteína de la familia de Wnt se selecciona del grupo que consiste en Wnt1, Wnt3, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt7a, Wnt8a, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 y Wnt16. En una realización preferida, la proteína Wnt es Wnt3a. En una realización, la proteína Wnt es una proteína recombinante. En otra realización, el medio de cultivo se condiciona por células L de ratón productoras de Wnt.

En una realización, el medio de cultivo además comprende un agente de mantenimiento. En una realización, el agente de mantenimiento es un factor de inhibición de leucemia (LIF).

Otros objetos y ventajas serán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada

Antes de describir los métodos, constructos y ratones transgénicos de la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos, constructos, animales transgénicos y condiciones experimentales descritas, ya que todos pueden variar. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no se pretende que sean limitantes, ya que el alcance de la presente invención se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "uno" y "el", "la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, por ejemplo, "una célula" incluye una pluralidad de células. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un método" incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o las cuales sean evidentes para aquellos expertos en la técnica al leer esta divulgación.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden emplear cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento, en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos, constructos y materiales preferidos se describen a continuación.

Definiciones

El término "célula madre embrioide tipo ES" incluye una célula la cual, tras ser introducida en un embrión, puede contribuir en cualquier tejido del embrión en desarrollo.

Los términos "contribución aumentada", "mayor porcentaje relativo" y similares, incluyen una contribución de material genético mejorada de una célula donante eucariótica a un organismo resultante del desarrollo posterior de un embrión huésped modificado en estadio temprano. El método de la invención proporciona medios de aumentar la probabilidad de que las células introducidas en el embrión huésped contribuyan a todos los tejidos, incluyendo los tejidos de la línea germinal, del animal generado.

El término "knock-out génico" tal como se emplea en el presente documento significa una modificación genética resultante de la interrupción de la información genética codificada en un locus cromosómico. Por "knock-in génico" tal como se emplea en el presente documento se entiende una modificación genética resultante de un reemplazo de información genética codificada en un locus cromosómico con una secuencia de ADN distinta o la inserción de información genética exógena en un locus cromosómico. Por "animal knock-out" tal como se emplea en el presente documento se entiende un animal en el cual una proporción significativa de las células del animal portan un knock-out génico. Por "animal knock-in" tal como se emplea en el presente documento se entiende un animal en que una

proporción significativa de las células del animal portan knock-in génico.

Descripción general

Uno de los componentes deseados de un estudio con animales transgénicos es un animal transgénico modificado genéticamente capaz de transmitir la modificación genética a su progenie, es decir, un animal transgénico que comprende la modificación genética en su línea germinal. Los métodos actuales para crear tales animales transgénicos con capacidad de transmisión tienden a ser ineficientes en términos de recursos y tiempo empleado. Por ejemplo, para generar un animal transgénico modificado genéticamente capaz de transmitir la modificación genética a su progenie, se inyecta una célula ES modificada heterocigótica para una modificación genética deseada en un embrión blastocístico receptor, y el embrión receptor se implanta en una madre subrogada para la gestación y alumbramiento de la progenie transgénica. La progenie transgénica resultante es quimérica ya que algunos de los tejidos de la progenie se derivan de las células ES inyectadas mientras que otros tejidos de la progenie se derivan de las células procedentes del embrión receptor. Debido a este quimerismo, las células ES inyectadas que comprenden la modificación genética pueden o no formar tejidos de la línea germinal en la progenie y ser capaces de transmitir la modificación genética a la generación siguiente. Para determinar si una quimera es capaz de transmitir la modificación genética, se debe cruzar la quimera con otro animal que no porte la misma modificación genética para establecer si la modificación deseada se transmite a la progenie resultante (F1). La detección de la modificación genética deseada en la progenie F1 del cruce entre la quimera y el otro animal establece que la quimera porta la modificación genética deseada en su línea germinal y es capaz de transmitir la modificación a su progenie (transmisión de la línea germinal). Típicamente, aproximadamente el 50 % de las quimeras exhiben transmisión por la línea germinal, El color del pelaje es el marcador que se emplea con más frecuencia del alcance de la contribución de la célula ES a la quimera y la transmisión del contenido genético de la célula ES a la progenie F1.

La actual necesidad de generar una generación F1 para determinar si la quimera es capaz de transmitir la modificación genética es ineficiente y costosa en términos de tiempo y de costes de cría y mantenimiento de la progenie F1. Se proporciona un método para mejorar la eficiencia del proceso para generar animales transgénicos mediante la presente invención la cual permite la introducción, en embriones en pre-mórula, de células que generan animales que tienen una contribución aumentada de material genético de las células exógenas en relación a los resultados obtenidos cuando las células donantes se introducen en embriones en estadios posteriores, por ejemplo, blastocistos. Como resultado, un porcentaje mucho mayor de los animales de F0 son 100 % transmisores de la línea germinal. En muchos casos los animales de F0 son transmisores al 100 % en la línea germinal y por tanto esos animales de F0 pueden transmitir los materiales de las células ES a toda su descendencia.

Introducir células donantes en embriones en estadios tempranos, por ejemplo, embriones de 8 células, proporciona varios beneficios importantes respecto de los métodos actuales, que enseñan el uso de embriones huésped en estadios posteriores, por ejemplo, blastocistos. Tal como se muestra en el Ejemplo 1 a continuación, el número de embriones en estadio temprano recolectados de una madre donante (por ejemplo, un ratón BL/6 hembra) es mayor que el número de embriones en estadios posteriores recolectados. Por tanto, se necesitan menos ratones hembra preñados como donantes, disminuyendo el coste de obtención y mantenimiento de ratones hembra preñados.

Además, tal como se muestra a continuación, las células donantes pueden introducirse en un número menor de embriones en estadios tempranos que en los embriones en estadios posteriores para generar el mismo número de animales quiméricos, reduciendo el tiempo y coste de introducción de células donantes en embriones, por ejemplo, cuando la introducción se efectúa mediante microinyección, la cantidad de tiempo empleada en las microinyecciones se reduce en gran medida.

La presente invención también permite cultivar el embrión huésped que contiene a la célula donante hasta estadios post-mórula, por ejemplo, hasta un estadio de blastocisto o un estadio de gástrula, antes introducirlos en una madre subrogada para la gestación. Ya que las condiciones de cultivo *in vitro* son más favorables para las células donantes que para el embrión huésped, el embrión resultante tiene un contenido mayor de células derivadas de las células donantes en comparación con el método mediante el cual el embrión huésped en estadio de mórula se introduce en una madre subrogada para la gestación.

Una mejora importante proporcionada por la presente invención es que el número de animales generados que son capaces de transmitir el ADN donante aumenta sustancialmente con el uso de embriones huésped en estadios tempranos, de tal forma que se elimina una generación entera de cría. Esto es una mejora práctica significativa con implicaciones comerciales importantes.

Un método conocido en la técnica que permite eliminar una generación entera de cría emplea embriones tetraplontes como receptores de las células donantes modificadas. Ya que las células tetraploides del embrión receptor son incapaces de contribuir a los tejidos del animal en desarrollo, los animales que nacen se derivan completamente de las células donantes modificadas. Si los animales resultantes no tienen una modificación genética que afecte a la fertilidad, serán capaces de transmitir la modificación genética deseada a su progenie tras el emparejamiento. Este proceso es laborioso e ineficiente, produciendo una pequeña fracción de animales nacidos

vivos únicamente a partir de líneas celulares ES híbridas. Las inyecciones de células bajo la zona pelúcida de los embriones diploides en estadio de pre-mórula produce una supervivencia aumentada y una generación de un número mayor de animales vivos derivados completamente o prácticamente por completo de células ES. Se pueden obtener machos y hembras mediante este método.

El método de la invención puede aplicarse para introducir células ES endógamas en embriones receptores exógamos mediante microinyección.

Otras características de la invención serán evidentes en el transcurso de las siguientes descripciones de realizaciones ejemplares, las cuales se proporcionan a modo de ilustración de la invención y que no pretenden ser limitativas de la misma.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica ejemplos de cómo efectuar y emplear los métodos, composiciones y animales de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión respecto de los números empleados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se pueden esperar algunas desviaciones experimentales como es conocido para un experto en la técnica. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es próxima a o la atmosférica.

Ejemplo 1. Generación de animales transmisores de la línea germinal

Los embriones para la inyección se obtuvieron a partir de cruzamientos naturales donde la mañana de la implantación se designó a los 0,5 días p.c (post coitus). Se recogieron los oviductos de las hembras implantadas 2,5 días p.c. y se irrigaron con medio de Dulbecco para recolectar embriones de 8 células. Los embriones se mantuvieron en este medio para su cultivo (en un incubador a 37 °C al 5 % de CO₂) y para los procedimientos de microinyección.

La inyección de los embriones de 8 células se realizó empleando técnicas estándar de microinyección excepto en que antes de la introducción de células ES, se generó un agujero en la zona pelúcida del embrión de 8 células utilizando un sistema láser XYClone según las instrucciones del fabricante. La aguja de inyección se inserta a través de este agujero y se depositan entre 6 y 10 células ES en el espacio perivitelino.

Los embriones inyectados se transfirieron a una placa de cultivo con KSOM+AA y se cultivaron durante la noche hasta el estadio de blastocisto. Los embriones supervivientes se transfirieron como blastocistos a hembras subrogadas en la tarde del día siguiente (3,5 días p.c).

Ejemplo 2. Generación de un ratón "knock-out" homocigótico para DLL4

Tal como se describe anteriormente se microinyectaron células ES knock-out homólogas para DLL4 en un embrión de ratón de 8 células. Los embriones inyectados se cultivaron hasta el estadio de blastocisto y se transfirieron a una hembra subrogada para su gestación. Todos los embriones knock-out para DLL4 murieron durante la gestación. La causa de la muerte fue idéntica a la observada en embriones producidos mediante el cruzamiento convencional de ratones heterocigóticos. La observación de la ausencia de fenotipo nulo en DLL en la generación F0 evitó el cruzamiento de dos generaciones que normalmente se requiere para generar ratones con fenotipo nulo en DLL4.

Ejemplo 3. Generación de ratones con modificaciones genéticas de F0 altamente y totalmente derivados de células ES

Las células masculinas ES genéticamente modificadas de la F1 H4 se microinyectaron en embriones C57BL/6, tanto de 8 células como en blastocisto. Los embriones blastocísticos microinyectados se transfirieron a una hembra subrogada inmediatamente después de la inyección. Los embriones de 8 células microinyectados se cultivaron además en medio de cultivo KSOM+AA hasta el estadio de blastocisto y se transfirieron a una hembra subrogada para la gestación. Los porcentajes de contribución de las células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones macho de F0. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Tal como se muestra, cuando las células ES modificadas genéticamente se microinyectaron en embriones de 8 células, todos los ratones de F0 se derivan de células ES. Por otro lado, cuando las células modificadas genéticamente se microinyectaron en embriones en estadio de blastocisto, ninguno de los machos de F0 se derivaron completamente de las células ES y solo aproximadamente la mitad de los ratones macho de F0 (2 de 4 y 4 de 7 para 494B-F5 Y 1218X-E2, respectivamente) tienen más del 90 % de células derivadas de células ES.

Tabla 1

Línea celular ES	Embriones		Número de crías		Nº de ratones macho de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES*				
	Estadio	Nº	Total	Machos	< 50%	50% al 80%	90 %	> 90 %	100 %
494B-F5	8 células	33	11	11	0	0	0	0	11
494B-F5	Blastocisto	20	5	4	0	0	2	2	0
1218X-E2	8 células	50	6	6	0	0	0	0	6
1218X-E2	Blastocisto	36	7	4	0	0	0	4	0

*Los porcentajes de contribución de células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones de F0.

Se emplearon más líneas celulares ES para ensayar el efecto del estadio del embrión huésped (8 células vs. blastocisto) sobre la contribución de la célula ES en el ratón macho de F0 resultante. Se obtuvieron resultados similares y se resumen en la Tabla 2 (* Los porcentajes de contribución de células ES se estimaron mediante el color del pelaje de los ratones de F0).

Tabla 2

Línea celular ES	Embriones		Número de crías		Nº de ratones macho de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES*				
	Estadio	Nº	Total	Machos	< 50%	50% al 80%	90 %	> 90 %	100 %
F1H4 parental	8 células	120	34	30	3	0	0	0	27
F1H4 parental	Blastocisto	125	24	20	5	1	2	12	0
609B-G2	8 células	50	17	15	2	0	0	0	13
609B-G2	Blastocisto	50	21	16	1	0	1	14	0
698B-A8	8 células	25	5	4	1	0	0	1	2
698B-A8	Blastocisto	25	9	6	3	3	0	0	0
639C-A9	8 células	37	12	11	1	0	0	0	10
639C-A9	Blastocisto	25	7	7	0	0	0	7	0
619A-A1	8 células	25	12	11	1	0	0	0	10
619A-A1	Blastocisto	25	7	6	0	0	0	6	0
576A-E11	8 células	25	12	10	1	0	0	0	9
576A-E11	Blastocisto	25	21	16	2	1	1	12	0

Ejemplo 4. Generación de ratones hembra de F0 elevadamente y completamente derivados de células ES

Se microinyectaron células ES XO modificadas genéticamente (clon 648B-H12) en embriones C57BL/6 tanto en estadio de 8 células como de blastocisto. Los embriones blastocísticos microinyectados se transfirieron a una hembra subrogada para la gestación inmediatamente después de la inyección. Los embriones de 8 células microinyectados se cultivaron posteriormente en medio de cultivo KSOM+AA hasta el estadio de blastocisto y posteriormente se transfirieron a una hembra subrogada para la gestación. Los porcentajes de contribución de células ES en los ratones hembra de F0 se estimaron por el color de su pelaje. Como se muestra en la Tabla 3, cuando las células ES XO modificadas genéticamente se microinyectaron en embriones de 8 células, todas las quimeras fueron hembras. Cuando las células ES modificadas se microinyectaron en embriones en estadio de blastocisto, únicamente 7 ratones F0 de un total de 16 para 648B-H12 y 11 ratones de F0 de un total de 16 para 648C-H1 fueron hembras (* El porcentaje de contribución de células ES se determinó por el color del pelaje de los ratones F0).

Tabla 3

Clon XO	Embriones SW		Crías	Nº de quimeras		Nº de ratones hembra de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES*		
	Estadio	Nº		Total	Hembras	<90%	>90%	100%
648B-H12	8 células	50	13	13	13	0	0	13
648B-H12	Blastocisto	50	28	16	7	1	6	0
648C-H1	8 células	50	6	6	6	0	0	6
648C-H1	Blastocisto	50	27	16	11	1	10	0

Ejemplo 5. Generación de ratones de F0 completa y totalmente derivados de células ES empleando embriones huésped endógamos y exógamos

Se microinyectaron células ES masculinas endógamas (C57BL/6) o híbridas (F1 H4) en embriones Swiss Webster (SW) tanto en estadio de 8 células como estadio de blastocisto. Los embriones blastocísticos microinyectados se transfirieron a una hembra subrogada para la gestación inmediatamente después de la inyección. Los embriones de 8 células microinyectados se cultivaron posteriormente en medio de cultivo KSOM+AA hasta el estadio de blastocisto y se transfirieron a continuación a una hembra subrogada para la gestación. Los resultados se resumen en la Tabla 4 (* Los porcentajes de contribución de células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones de F0).

Tabla 4

Células ES	Embriones SW		Nº de crías		Nº de ratones macho F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES*		
	Estadio	Nº	Total	Machos	<90%	>90%	100%
F1H4	8 células	140	46	46	34	4	8
F1H4	Blastocisto	50	11	11	11	0	0
C57/BL6.2	8 células	75	19	6	0	0	6
C57/BL6.2	Blastocisto	10	7	6	6	0	0

Se obtuvieron resultados similares cuando se microinyectaron células ES masculinas endógamas 129 (CJ7) y Balb/c en embriones huésped endógamos C56BL/6 tanto en estadio de 8 células como de blastocisto. Los resultados se resumen en la Tabla 5 (* Los porcentajes de contribución de células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones de F0).

Tabla 5

Células ES	Embriones C56B/6		Nº de crías		Nº de ratones macho de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES*		
	Estadio	Nº	Total	Machos	<90%	>90%	100%
129 (CJ7)	8 células	57	8	8	3	0	5
129 (CJ7)	Blastocisto	50	18	14	4	10	0
Balb/c	8 células	50	11	11	5	0	6
Balb/c	Blastocisto	57	8	1	1	0	0

Ejemplo 6. Los ratones de F0 altamente y totalmente derivados de células ES son competentes en la transmisión de la línea germinal

Los ratones macho de F0 derivados de F1H4 que tenían más del 90 % de células derivadas de células ES (más del 90 % de contribución de células ES) se emplearon para ensayar la competencia de transmisión de la línea germinal. Empleando células ES masculinas, los ratones macho de F0 sexualmente maduros se cruzaron con hembras sexualmente maduras. El color del pelaje de la descendencia se empleó como marcador para evaluar la competencia de transmisión por la línea germinal. Los resultados se resumen en la Tabla 6. Cuando se emplearon embriones en estadio de 8 células como embriones huésped, más del 95 % (51 de 53) de los machos de F0 generados mediante microinyección en 8 células mostraron un 100 % de competencia de transmisión de la línea germinal. Cuando se emplearon embriones en estadio de blastocisto como embriones huésped, únicamente alrededor del 64 % (57 de 89) de los machos de F0 mostraron un 100 % de competencia de transmisión de la línea germinal. Además, aproximadamente el 21 % (19 de 89) de los machos de F0 generados por microinyección en blastocisto no produjeron ninguna descendencia en comparación con menos del 4 % (2 de 53) de los machos de F0 generados por microinyección en 8 células sin descendencia (** Los porcentajes de competencia de transmisión de la línea germinal se estimaron por el color del pelaje de la descendencia correspondiente).

Tabla 6

Estadio del embrión Huésped	Nº de machos de F0 criados	Nº de machos de F0 que mostraron varios porcentajes de competencia en la transmisión por la línea germinal**			Nº de machos de F0 sin descendencia
		100%	Parcial	Cero	
8 células	53	51	0	0	2
Blastocisto	89	57	9	4	19

Ejemplo 7. Efecto del medio de cultivo post-microinyección en la calidad de los ratones de F0

Se microinyectaron células masculinas de C57BL/6 y F1 H4 modificadas en embriones Swiss Webster (SW) en estadio de 8 células. Los embriones microinyectados se cultivaron en distintos medios de cultivo hasta el estadio de blastocisto y se transfirieron posteriormente a una hembra subrogada para la gestación. Se emplearon tres medios de cultivo distintos: (1) KSOM, medio de cultivo para embriones de ratón; (2) LIF, medio de cultivo para células ES que contiene LIF; (3) Wnt3, medio de cultivo para células ES condicionado con Wnt3. Los resultados se resumen en la Tabla 7. El medio para ES condicionado con Wnt3 se produjo de la siguiente forma: (i) se sembraron células L de ratón en un flask (frasco de Roux) T75 en un medio preparado con DMEM alto en glucosa, FBS 10 % y L-glutamina, y se incubaron a 37 °C, con CO₂ 5 %; (ii) cuando la densidad de células alcanzó una confluencia del 100 %, se resemeó un 10 % de las células en otro flask T75; (iii) se recogió el medio de cultivo hasta que la densidad de células alcanzó de nuevo la confluencia (aproximadamente 3 días después de la resiembra); y finalmente, (iv) el medio de cultivo recogido se mezcló con un volumen igual de medio de cultivo para células ES sin LIF pero con sustitución de suero (* los porcentajes de contribución de células ES se estimaron por el color del pelaje de los ratones de F0).

Tabla 7

Células ES	Medio de cultivo	Nº de embriones transferidos	Nº de crías		Nº de ratones macho de F0 con diversos porcentajes de contribución de células ES*	
			Total	Machos	<100%	100%
F1H4	KSOM	140	55	45	37	8
F1H4	LIF	40	8	8	3	5
F1H4	Wnt3	40	9	9	2	7
C57BL/6.2	KSOM	75	16	16	10	6
C57BL/6.2	LIF	38	10	10	5	5
C57BL/6.2	Wnt3	38	11	11	0	11

Se obtuvieron resultados similares cuando se microinyectaron células de F1 H4 masculinas modificadas en embriones ES C57BL/6 de 8 células.

Ejemplo 8. Generación de animales homocigóticos para una modificación genética a partir de células ES heterocigóticas

Se microinyectan células ES masculinas heterocigóticas para una modificación genética deseada en un embrión de ratón de 8 células como se describe en el Ejemplo 1. Las células ES femeninas derivadas de las misma línea celular ES que las masculinas, y heterocigóticas para la misma modificación genética se microinyectan en otro embrión de ratón de 8 células como se describe anteriormente. Ambos embriones se cultivan hasta el estadio de blastocisto y se transfieren a una hembra subrogada para la gestación, Los machos y hembras resultantes de F0 transmisores de la línea germinal se cruzan para obtener progenie homocigótica para la modificación genética deseada. Se cruzan dos parejas de ratones. Nacieron un total de 39 crías y 9 de ellas eran homocigóticas para la modificación genética.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar un embrión de ratón que comprende células que son homocigóticas para una modificación genética, que comprende:
 - (a) introducir células donantes de ratón en un embrión huésped en pre-mórula, en donde las células donantes comprenden células ES o células tipo ES de un ratón endógamo, y que son homocigóticas para la modificación genética; y
 - (b) cultivar el embrión huésped en pre-mórula de (a) hasta el estadio de blastocisto en donde al menos el 90 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende introducir el embrión de (b) en una madre ratón subrogada para la gestación.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde las células donantes de ratón homocigóticas para la modificación genética se generan mediante un proceso seleccionado de el grupo que consiste en conversión génica, dirigir ambos alelos del mismo gen, y dirigir o bien un gen ligado a X- o bien a Y- en las células ES o tipo ES.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde (i) al menos el 95 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes, o (ii) al menos el 99 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.
5. Un método para generar un embrión de ratón que comprende células que son heterocigóticas para una modificación genética, que comprende:
 - (a) introducir células donantes de ratón en un embrión huésped de ratón en pre-mórula, en donde las células donantes son células ES o tipo ES de un ratón endógamo; y son heterocigóticas para la modificación genética; y
 - (b) cultivar el embrión huésped en pre-mórula de (a) hasta el estadio de blastocisto, en donde al menos un 90 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.
6. El método de la reivindicación 5, que además comprende gestar el embrión de (b) en una madre ratón subrogada.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde (i) al menos un 95 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes, o (ii) al menos el 99 % de las células de un ratón que se desarrolla a partir del blastocisto se derivan de las células donantes.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el embrión huésped en pre-mórula es: (i) un embrión diploide; y/o (ii) procedente de una cepa endógama o una cepa exógama.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el embrión huésped en pre-mórula es un embrión en estadio de 8 células.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el embrión huésped en pre-mórula comprende una zona pelúcida, y en donde las células donantes de ratón se introducen en el embrión huésped de ratón a través de una abertura en la zona pelúcida; de manera opcional en donde la abertura se crea mediante un láser.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células donantes modificadas genéticamente se generan mediante:
 - (a) la obtención de un fragmento genómico elongado que contiene una secuencia de ADN de interés;
 - (b) el empleo de recombinación bacteriana homóloga para modificar genéticamente el fragmento genómico elongado de (a) para crear un vector de elongación (LTVEC) para su uso en las células donantes;
 - (c) introducir el LTVEC de (b) en las células donantes para modificar el gen endógeno o locus cromosómico en las células; y
 - (d) emplear un ensayo cuantitativo para detectar la modificación de alelos en las células donantes de (c) para identificar aquellas células donantes en donde el gen endógeno o locus cromosómico se han modificado genéticamente.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células ES donantes proceden de una cepa de ratón endógamo seleccionada de entre el grupo que consiste en 129, C67BL/6 y BalbC.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el embrión huésped de ratón comprende un embrión endógamo de la cepa C57BL/6 o un embrión exógamo de la cepa Swiss Webster.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa de cultivo (b) se condiciona por un factor de crecimiento, opcionalmente una proteína de la familia de Wnt; preferentemente Wnt3a.
- 5 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende la gestación del embrión de ratón modificado genéticamente para generar un ratón modificado genéticamente, en donde (i) cuando las células donantes son homocigóticas para la modificación genética, al menos el 90 % de las células del ratón modificado genéticamente son homocigóticas para la modificación genética; o (ii) cuando las células donantes son heterocigóticas para la modificación genética, al menos el 90 % de las células en el ratón modificado genéticamente son heterocigóticas para la modificación genética.
10
16. El método de acuerdo con la reivindicación 15(i) en donde: (a) al menos el 95 % de las células en el ratón modificado genéticamente son homocigóticas para la modificación genética; o (b) al menos el 99 % de las células del ratón modificado genéticamente son homocigóticas para la modificación genética; o
15 el método de acuerdo con la reivindicación 15(ii), en donde:
 - (a) al menos el 95 % de las células en el ratón modificado genéticamente son heterocigóticas para la modificación genética, o
 - (b) al menos el 99 % de las células en el ratón modificado genéticamente son heterocigóticas para la modificación genética.
20
17. El método de acuerdo con la reivindicación 15(i), en donde al menos el 90 % de las células germinales en el ratón modificado genéticamente son homocigóticas para la modificación genética; o
25 el método de acuerdo con la reivindicación 15(ii), en donde al menos el 90 % de las células germinales en el ratón modificado genéticamente son heterocigóticas para la modificación genética.
25
18. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde las células donantes son células femeninas XO y el ratón modificado genéticamente es un ratón XO.
- 30 19. Un embrión de ratón pre-mórula el cual comprende células donantes de ratón introducidas bajo la zona pelúcida, en donde las células donantes comprenden células ES o tipo ES procedentes de un ratón endógamo que son heterocigóticas u homocigóticas para una modificación genética.
20. El embrión de ratón en pre-mórula de la reivindicación 19, en donde el embrión en pre-mórula es un embrión en estadio de 8 células.
35
21. El embrión en pre-mórula de la reivindicación 19, en donde dichas células donantes ES proceden de una cepa de ratón endógama seleccionada de entre el grupo que consiste en 129, C57BL/6 y BalbC.