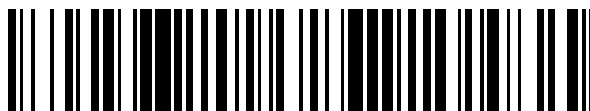


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 068**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61D 19/00 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2009 PCT/US2009/036276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009 WO09114400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2009 E 09718915 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2262898**

54 Título: **Ratones derivados de células ES a partir de inyección de un embrión hospedador diploide**

30 Prioridad:
07.03.2008 US 34807 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2018

73 Titular/es:
**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:
**POUEYMIROU, WILLIAM;
DECHIARA, THOMAS, M.;
AUERBACH, WOJTEK;
ECONOMIDES, ARIS, N.;
GALE, NICHOLAS, W.;
FRENDEWEY, DAVID y
VALENZUELA, DAVID, M.**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 665 068 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

Ratones derivados de células ES a partir de inyección de un embrión hospedador diploide

5 Campo

La generación de animales no humanos modificados genéticamente alterando sus genomas; la generación de animales no humanos que tienen una contribución genética de una célula donante no humana por combinación de la célula donante no humana con un embrión no hospedador no humano.

10

Antecedentes

Los métodos para modificar células eucariotas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.586.251. Los métodos para generar animales que tienen contribuciones de células donantes combinando células donantes y embriones hospedadores también son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.294.754. Existe la necesidad en la técnica de métodos adicionales para generar animales que tengan contribuciones de células donantes exponiendo un embrión hospedador a células donantes.

15

Breve resumen

20

La invención proporciona un embrión de ratón, que comprende una célula que tiene en su genoma:

(a) un gen de recombinasa específica de sitio unido de forma funcional a un promotor Nanog que expresa el gen de recombinasa específica de sitio en una célula de la masa celular interna (ICM) pero no del trofotodermo;

25

(b) un gen que codifica una toxina, unido de forma funcional a un promotor, donde el gen de toxina está presente en un locus que permite la expresión; y

(c) una secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen que codifica la toxina, donde la secuencia de ácido nucleico está localizada entre el promotor del gen que codifica la toxina y la secuencia codificante del gen que codifica la toxina y está flanqueada en ambos lados por sitios de reconocimiento de recombinasa de modo que en presencia de la recombinasa específica de sitio se elimina la secuencia de nucleótidos y el promotor para el gen que codifica la toxina dirige la transcripción del gen que codifica la toxina.

30

La invención proporciona además un método para generar un ratón o embrión de ratón a partir de una célula donante de ratón y un embrión hospedador, que comprende:

35

(a) introducir células donantes de ratón en un embrión hospedador de ratón, donde las células donantes de ratón se seleccionan del grupo que consiste en células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes (PS) o células madre pluripotentes inducidas (iPS), y donde el embrión hospedador es un embrión en estadio de premórula y comprende

40

(i) un gen de recombinasa específica de sitio unido de forma funcional a un promotor Nanog que expresa el gen de recombinasa específica de sitio en una célula de la masa celular interna (ICM), pero no del trofotodermo; y

45

(ii) un gen que codifica una toxina, unido de forma funcional a un promotor, donde el gen de la toxina está presente en un locus que permite la expresión; y

(iii) una secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen que codifica la toxina, donde la secuencia de ácido nucleico está localizada entre el promotor para el gen que codifica la toxina y la secuencia codificante del gen que codifica la toxina y está flanqueada en ambos lados por sitios de reconocimiento de recombinasa de modo que en presencia de la recombinasa específica de sitio se elimina la secuencia de nucleótidos y el promotor para el gen que codifica la toxina dirige la transcripción del gen que codifica la toxina;

50

(b) gestar el embrión de la etapa (a) en una hembra de ratón pseudopreñada.

55

La invención adicionalmente proporciona una pareja de cría de ratones modificados genéticamente que, cuando se cruzan, generan un embrión que comprende una primera construcción de ácido nucleico y una segunda construcción de ácido nucleico en su genoma, comprendiendo dicha pareja de cría un primer ratón que comprende una primera construcción de ácido nucleico en su genoma y un segundo ratón que comprende una segunda construcción de ácido nucleico en su genoma,

60

donde la primera construcción de ácido nucleico comprende un gen de recombinasa específica de sitio unido de forma funcional a un promotor Nanog que expresa el gen de recombinasa específica de sitio en una célula de la masa celular interna (ICM), pero no del trofotodermo, y

donde la segunda construcción de ácido nucleico comprende un gen que codifica una toxina y una secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen que codifica la toxina, donde el gen que codifica la toxina está unido de forma funcional a un promotor y está presente en un locus que permite la expresión, donde la secuencia de

65

ácido nucleico está localizada entre el promotor para el gen que codifica la toxina y la secuencia codificante del gen que codifica la toxina y está flanqueada en ambos lados por sitios de reconocimiento de recombinasa de modo que en presencia de la recombinasa específica de sitio la secuencia de nucleótidos se elimina y el promotor de gen que codifica la toxina dirige la transcripción del gen que codifica la toxina.

5 La invención también proporciona un ratón que comprende el embrión de ratón de la invención.

Se describen métodos y composiciones en este documento para generar un animal o embrión no humano introduciendo una célula donante no humana en un embrión hospedador no humano y haciendo crecer el embrión en un animal hospedador no humano para obtener un animal que derive de la célula donante, incluyendo embriones o animales no humanos que derivan de células donantes en su totalidad o en una parte sustancial.

15 Las composiciones y métodos para eliminar, inactivar, bloquear la diferenciación de, o hacer que las células ICM de un embrión no humano sean incapaces de proliferar, también se describen en este documento, así como construcciones de ADN y animales modificados genéticamente para generar embriones hospedadores no humanos que sean capaces de generar una ICM cuyas células no puedan proliferar o diferenciarse o contribuir a un embrión en desarrollo.

20 También se describen composiciones y métodos en este documento para generar embriones no humanos donde la ICM está ausente o es incapaz de proliferar o es sustancialmente incapaz de proliferar, y donde los embriones no humanos son adecuados para recibir células donantes no humanas que son capaces de poblar el embrión.

25 En un primer aspecto de la divulgación, se describe un embrión de ratón en este documento, que comprende una célula que tiene en su genoma (a) un gen de recombinasa específica de sitio unido de forma funcional a un promotor regulado por el desarrollo que expresa el gen de recombinasa específica de sitio en una célula de la masa celular interna (ICM) durante una fase embrionaria; y (b) un gen cuya expresión evita la proliferación de una célula ICM, donde la expresión del gen cuya expresión evita la proliferación de la célula ICM se induce por la presencia de la recombinasa específica de sitio.

30 La recombinasa específica de sitio puede seleccionarse del grupo que consiste en Cre, Cre modificada, Dre, Flp, Flpe, Flp(o) y phiC31. En una realización específica, la recombinasa específica de sitio es Cre.

35 En un aspecto de la divulgación, el promotor regulado por el desarrollo es un promotor para un gen que no se transcribe en la naturaleza en un animal de tipo silvestre antes de una fase embrionaria seleccionada de un estadio de 4 células, un estadio de 8 células, un estadio de 16 células, un estadio de 32 células, un estadio de 64 células, un estadio de blastocisto donde el endodermo primitivo no se ha formado sustancialmente y un estadio de blastocisto donde el endodermo primitivo está sin formar. En un aspecto de la divulgación, el promotor regulado por el desarrollo es un promotor para un gen que no se transcribe en la naturaleza en un animal de tipo silvestre antes de una fase embrionaria seleccionada de un estadio de Theiler (TS) TS2, TS3, TS4, TS5 y TS6.

40 En un aspecto de la divulgación, el promotor regulado por el desarrollo se selecciona de un promotor para uno de los siguientes genes, o un fragmento transcripcionalmente eficaz de los mismos: Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4, Fgf4, Rex1, Cripto, Dax, Esg1, Nat1 y Fbx15. En una realización específica, el promotor es un promotor Nanog. Un fragmento transcripcionalmente eficaz incluye fragmentos de promotores de los genes mencionados anteriormente que no se han vuelto incapaces de mantener la transcripción de un gen unido de forma funcional al fragmento.

45 El embrión de ratón puede seleccionarse de un embrión de una cepa endogámica, una cepa híbrida, una cepa exogámica y una cepa mixta. Específicamente, la cepa de ratón se selecciona de una cepa 129, una cepa BALB/c, una cepa C57BL/6 y un híbrido de dos cepas cualesquiera de las mencionadas anteriormente. La cepa de ratón puede seleccionarse de una mezcla de cualquiera de las cepas mencionadas anteriormente. En un aspecto específico de la divulgación, el ratón es una mezcla de las cepas C57BL/6 y 129. En un aspecto específico de la divulgación, el ratón es una cepa exogámica seleccionada de Swiss Webster, ICR, CD1 y MF1.

50 El embrión hospedador muestra cualquier ploidía. En un aspecto de la divulgación, el embrión hospedador se selecciona de un embrión hospedador diploide y un embrión hospedador tetraploide. En un aspecto específico de la divulgación, el embrión hospedador es un embrión hospedador diploide.

55 En un aspecto de la divulgación, la fase embrionaria se selecciona de un estadio de 1 célula, un estadio de 2 células, un estadio de 4 células, un estadio de 8 células, un estadio de 16 células, un estadio de 32 células y un estadio de 64 células. En un aspecto de la divulgación, el embrión está en una fase seleccionada de un estadio de premórula, un estadio de mórula, un estadio de mórula no compactada y un estadio de mórula compactada. En un aspecto de la divulgación, la fase embrionaria se selecciona de un estadio de Theiler 1 (TS1), una TS2, una TS3, una TS4, una TS5 y una TS6, con referencia a los estadios de Theiler descritos en Theiler (1989) "The House Mouse: Atlas of Mouse Development," Springer-Verlag, Nueva York. En un aspecto específico de la divulgación, el estadio de Theiler se selecciona de TS1, TS2, TS3 y TS4. En un aspecto de la divulgación, la fase embrionaria es un estadio de blastocisto. En un aspecto específico de la divulgación, la fase embrionaria es un estadio de blastocisto,

donde el endodermo primitivo está aún sin formar o está aún, sustancialmente sin formar. En un aspecto de la divulgación, la formación del endodermo primitivo está no más de 1 % completa, en otro aspecto no más de un 5 % completa, en otro aspecto no más de un 10 % completa, en otro aspecto no más de un 25 % completa, en otro aspecto no más de un 50 % completa, en otro aspecto no más de un 75 % completa.

5 En un aspecto de la divulgación, el gen cuya expresión evita la proliferación de una célula ICM se selecciona de un micro-ARN, un ARNip, un gen que codifica una toxina o fragmento tóxicamente eficaz de la misma, fragmento de toxina diftérica A (DTA), DTA atenuada, tox-176, exotoxina-A, PE 40, timidina cinasa del virus del herpes simple 1, ricina, toxina Shiga y un gen que codifica un receptor para una toxina o un fragmento de unión a toxina del mismo.

10 En una realización específica, la toxina es DTA. En un aspecto de la divulgación, el gen cuya expresión evita la proliferación de una célula ICM es una proteína de fusión que comprende un dominio de toxina y un dominio de unión a ligando donde en presencia de un ligando que se une al dominio de unión a ligando (pero no en ausencia de ligando), el dominio tóxico es tóxico para la célula ICM. En un aspecto de la divulgación, la proteína de fusión comprende un dominio de toxina y un dominio de unión a ligando donde en ausencia de un ligando que se une al dominio de unión a ligando (pero no en presencia de ligando), el dominio tóxico es tóxico para la célula ICM. En un aspecto específico de la divulgación, la proteína de fusión se selecciona de DTA-ERT2 y caspasa3-ERT2 y el ligando es tamoxifeno.

20 La recombinasa específica de sitio induce la expresión del gen cuya expresión evita la proliferación de ICM eliminando una secuencia de ácido nucleico entre un promotor unido de forma funcional al gen cuya expresión evita la proliferación de ICM y el gen cuya expresión evita la proliferación de ICM. En un aspecto específico, el gen cuya expresión evita la proliferación de ICM es un gen de DTA, el promotor es un promotor Rosa y la secuencia de nucleótidos entre el promotor y el gen de DTA está flanqueado en ambos lados por sitios loxP, de modo que en presencia de Cre la secuencia de nucleótidos loxeada se elimina y el promotor Rosa entonces es capaz de dirigir la transcripción del gen de DTA.

30 En los aspectos descritos a continuación, la recombinasa específica de sitio, el promotor regulado por el desarrollo, el embrión, la ploidía del embrión, la fase embrionaria, el gen cuya expresión evita la proliferación de una célula ICM, la toxina, el gen que codifica la toxina o fragmento tóxicamente eficaz de la misma, la proteína de fusión y el promotor que es capaz de dirigir la transcripción del gen que codifica la toxina, incluye los aspectos descritos anteriormente para el primer aspecto de la divulgación, salvo que se especifique de otro modo o salvo que se excluya por el contexto de los aspectos indicados de la siguiente manera.

35 Se describe en este documento un método para generar un ratón o embrión de ratón a partir de una célula donante de ratón y un embrión hospedador, que comprende: (a) introducir una célula donante de ratón en un embrión hospedador de ratón, donde el embrión hospedador de ratón comprende (i) un gen de recombinasa específica de sitio unido de forma funcional a un promotor regulado por el desarrollo que expresa el gen de recombinasa específica de sitio en una célula de la masa celular interna (ICM) durante una fase embrionaria; y (ii) un gen cuya expresión evita la proliferación de una célula ICM, donde la expresión del gen cuya expresión evita la proliferación de la célula ICM se induce por la presencia de la recombinasa específica de sitio; (b) introducir la célula donante de ratón en el embrión hospedador de la etapa (a); y (c) gestar el embrión de la etapa (b) en una hembra de ratón seudopreñada.

45 La célula donante de ratón se selecciona de una célula ES, una célula PS y una célula iPS. En los aspectos y realizaciones descritos a continuación, las células donantes incluyen células ES, células PS y células iPS, salvo que se especifique de otro modo o salvo que las células ES, células PS y células iPS se excluyan por el contexto de los aspectos o realizaciones indicados de la siguiente manera.

50 En un aspecto, se proporciona un embrión no humano que carece de ICM o comprende ICM que es incapaz de proliferar o sustancialmente incapaz de proliferar.

55 En un aspecto, el embrión es capaz de servir como embrión hospedador para recibir células donantes no humanas que son capaces de poblar el embrión. En un aspecto específico de la divulgación, las células del embrión hospedador son diploides. En un aspecto específico de la divulgación, el embrión es diploide, comprende un trofotodermo y está en un estadio de pregastrulación.

60 En un aspecto de la divulgación, el embrión está en un críotubo. En otro aspecto de la divulgación, el embrión está en un medio que comprende un críoprotector. En un aspecto de la divulgación, el embrión se mantiene en un medio que comprende un críoprotector, donde el recipiente está en contacto con nitrógeno líquido.

65 En un aspecto, se describe en este documento un método para generar un embrión no humano adecuado como embrión hospedador para células donantes no humanas, comprendiendo el método eliminar físicamente la ICM. En una realización específica, eliminar físicamente la ICM comprende extraer toda o sustancialmente toda la ICM usando una jeringa o una aguja. En un aspecto específico, el embrión está en un estadio de pregastrulación y comprende un trofotodermo y una ICM.

En un aspecto, se describe en este documento un método para generar un embrión no humano adecuado como embrión hospedador para células donantes no humanas, comprendiendo el método eliminar químicamente las células ICM o provocar químicamente que sean incapaces de proliferar. En un aspecto, el embrión está en un estadio de pregastrulación y comprende un trofotodermo y una ICM. En un aspecto, la eliminación química de las células ICM comprende un método donde el embrión se expone a una sustancia que elimina las células ICM, pero no daña sustancialmente las células del trofotodermo. En un aspecto, la eliminación química de las células ICM comprende exponerlas a un agente que forma un enlace covalente con un componente de ICM o rompe un enlace covalente en un componente de ICM, donde la formación o rotura de un enlace covalente en un componente de ICM hace que la ICM sea incapaz de proliferar. En un aspecto específico, el agente se inyecta en la ICM. En otro aspecto específico, el trofotodermo se hace permeable al agente y el embrión se impregna en un medio que comprende el agente. En un aspecto, el agente es una sustancia que no es proteína y no es ácido nucleico.

En un aspecto, se describe en este documento un método para generar un embrión no humano adecuado como embrión hospedador para células donantes no humanas, donde el embrión comprende una ICM, que comprende: exponer el embrión a una condición física que es preferentemente perjudicial para las células de la ICM, pero no para el trofotodermo; o exponer la ICM a un anticuerpo conjugado con un agente que es tóxico para las células ICM, donde el anticuerpo reconoce un antígeno en las células ICM.

En un aspecto, la toxina o anticuerpo es sustancialmente incapaz de unirse a un antígeno en las células del trofotodermo. En un aspecto, el agente que es tóxico para las células de la ICM es no tóxico para las células del trofotodermo, o es insuficientemente tóxico para las células del trofotodermo de modo que el trofotodermo permanece funcional mientras que las células ICM se eliminan o se vuelven incapaces de proliferar. En otro aspecto, el método comprende generar un ratón modificado genéticamente que comprende un receptor para una toxina o anticuerpo, donde el receptor se expresa por células ICM, y exponer un embrión del ratón modificado genéticamente a la toxina o anticuerpo, donde las células ICM se eliminan o se vuelven incapaces de proliferar.

En un aspecto, se describe en este documento un ratón o embrión modificado genéticamente, donde el ratón o embrión modificado genéticamente comprende un gen que codifica un activador, donde el activador se expresa durante una fase embrionaria. El activador de este aspecto, y de los aspectos descritos en este documento, puede incluir, de acuerdo con el contexto, una recombinasa específica de sitio como se describe en otros aspectos y realizaciones de este documento. En diversos aspectos, el activador de este y otros aspectos puede incluir, de acuerdo con el contexto, una proteína que se expresa en la ICM, pero no se expresa en el trofotodermo.

En un aspecto, el gen que codifica el activador está unido de forma funcional a un promotor regulado por el desarrollo que expresa el gen que codifica el activador durante una fase embrionaria.

En un aspecto, el activador comprende una proteína. En un aspecto, la proteína es una recombinasa específica de sitio como se describe en este documento.

En un aspecto, el promotor regulado por el desarrollo es un promotor que dirige la expresión en células ICM, pero no en células del trofotodermo. En un aspecto específico, el activador es una recombinasa Cre y el promotor regulado por el desarrollo es un promotor del gen Nanog.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente es homocigótico para un gen de recombinasa Cre unido de forma funcional a un promotor regulado por el desarrollo.

En un aspecto, la fase embrionaria se selecciona de una fase en que el promotor para uno de los siguientes genes es activo: Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4, Fgf4, Rex1, Cripto, Dax, Esg1, Nat1 y Fbx15.

En un aspecto, se describe en este documento un embrión o ratón modificado genéticamente, donde el embrión o ratón modificado genéticamente comprende un gen cuya expresión es tóxica para una célula (es decir, un gen tóxico), donde el gen tóxico para una célula está presente en un locus que permite la expresión y donde el gen tóxico para la célula es incapaz de expresarse en ausencia de un activador.

En diversos aspectos, el gen cuya expresión es tóxica para una célula incluye un gen cuya expresión evita la proliferación de una célula ICM.

En un aspecto, el gen tóxico para una célula es incapaz de forma condicionada de expresarse debido a una secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen tóxico. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen tóxico está localizada entre un promotor y la secuencia codificante del gen tóxico. En un aspecto específico, la secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen tóxico está flanqueada en ambos lados por un sitio de reconocimiento de recombinasa, de modo que en presencia de una recombinasa que reconoce los sitios de reconocimiento de recombinasa, la secuencia de nucleótidos loxeada se elimina y el promotor entonces es capaz de dirigir la transcripción del gen tóxico. En un aspecto específico, el promotor es un promotor Rosa.

En un aspecto, la secuencia que evita la expresión del gen tóxico comprende una secuencia de determinación de la transcripción localizada entre el promotor y la secuencia codificante del gen tóxico y flanqueada en ambos lados por un sitio de reconocimiento de recombinasa.

5 En un aspecto, la secuencia flanqueada en ambos lados por el sitio de reconocimiento de recombinasa es una secuencia para un ácido nucleico o proteína seguida por una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización específica, la secuencia codifica una proteína fluorescente tal como, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), eGFP, CFP, YFP, eYFP, BFP, eBFP, DsRed y MmGFP; o se selecciona de un grupo de genes que confieren resistencia a un antibiótico/fármaco, tal como neomicina fosfotransferasa (neo^r), higromicina B fosfotransferasa (hyg^r), xantina/guanina fosforribosil transferasa (gtp) o fusiones de los mismos.

15 En un aspecto específico, el gen tóxico es una secuencia que codifica una proteína que es tóxica para una célula, tal como DTA, y entre el promotor y la secuencia codificante de la proteína tóxica (por ejemplo, entre el promotor y la secuencia codificante de DTA) hay una señal loxP de terminación de la transcripción del gen marcador loxP (marcador de parada floxeado), y precediendo a la señal de terminación del marcador floxeado hay una secuencia que codifica un sitio de corte y empalme 3' (aceptor de corte y empalme) que facilita la unión funcional de DTA a un promotor tras la eliminación de la secuencia de terminación del marcador floxeado por la recombinasa Cre.

20 En un aspecto, el promotor es un promotor que se inserta para que esté en proximidad a la secuencia codificante de DTA y es capaz de dirigir la expresión de DTA en presencia de activador. En otro aspecto, el promotor está en un locus donde el promotor típicamente se encuentra en la naturaleza.

25 En un aspecto, el gen tóxico está colocado en un locus que permite la expresión seleccionado por inserción aleatoria de una construcción de ácido nucleico que comprende un gen marcador y el tóxico, introduciendo la construcción de ácido nucleico en una célula (por ejemplo, una célula ES o PS empleada como célula donante para generar el ratón o embrión modificado) y cribado de las células para la expresión del marcador.

30 En un aspecto, el locus que permite la expresión se selecciona introduciendo una construcción de ácido nucleico que comprende un gen tóxico y brazos de homología dirigidos al gen tóxico en un locus preseleccionado o específico. En un aspecto específico, el locus que permite la expresión es el locus Gt(ROSA)26Sor.

35 En un aspecto, se describe en este documento una pareja de cría de ratones modificados genéticamente que, cuando se cruzan, generan un embrión que comprende (a) un locus activador, que comprende una secuencia que codifica un activador, unida de forma funcional a un promotor regulado por el desarrollo; y (b) un locus respondedor, que comprende un gen que es tóxico para una célula y una secuencia que evita la expresión del gen que es tóxico para la célula; donde el activador es capaz de modificar el locus respondedor para causar la expresión del gen que es tóxico para la célula.

40 En un aspecto, el locus activador comprende una secuencia que codifica una proteína activadora. En un aspecto, el locus respondedor comprende una secuencia que codifica un respondedor. El respondedor de este aspecto, y de los otros aspectos descritos en este documento que emplean un respondedor, puede incluir, de acuerdo con el contexto, una secuencia de ácido nucleico tóxica (por ejemplo, que codifica un micro-ARN tóxico o una proteína tóxica) descrita en otros aspectos de este documento. En un aspecto, el locus respondedor codifica una toxina, por ejemplo, DTA. En un aspecto, el locus respondedor comprende una secuencia que evita la transcripción de la secuencia de ácido nucleico tóxica en ausencia del activador, pero en presencia del activador la secuencia ya no evita la transcripción del ácido nucleico tóxico. En un aspecto específico, el locus respondedor comprende un promotor y la secuencia del ácido nucleico tóxico, que tiene una secuencia inhibidora de la transcripción flanqueada en ambos lados por sitios de reconocimiento de recombinasa ubicados entre el ácido nucleico tóxico y el promotor.

50 En un aspecto, los ratones se seleccionan cada uno independientemente de las cepas descritas en este documento.

55 En un aspecto, se describe en este documento un embrión de ratón que comprende (a) un locus activador, que comprende un gen que codifica un activador, donde el gen que codifica el activador está unido de forma funcional a un promotor regulado por el desarrollo; y (b) un locus respondedor, que comprende un gen que es tóxico para una célula y una secuencia que evita la expresión del gen que es tóxico para la célula, donde el activador es capaz de modificar el locus respondedor para causar la expresión del gen que es tóxico para la célula.

60 En un aspecto, el embrión de ratón está en una fase del desarrollo donde el promotor regulado por el desarrollo está expresando el gen activador.

65 En un aspecto, el embrión de ratón es un blastocisto que comprende células ICM que son incapaces de proliferar o sustancialmente incapaces de proliferar. En otro aspecto, el blastocisto comprende una célula de ratón donante que se ha introducido en el blastocisto. En un aspecto específico, la célula donante se selecciona de una célula ES y una célula madre pluripotente (PS) de ratón, por ejemplo, una célula madre pluripotente inducida (iPS). En un aspecto, la célula de ratón donante está modificada genéticamente.

En un aspecto, se describe en este documento un método para generar un ratón o embrión de ratón, a partir de una célula donante de ratón y un embrión hospedador, que comprende: (a) introducir una célula donante de ratón en un embrión hospedador de ratón, donde el embrión hospedador comprende (i) un locus activador que comprende un gen que codifica un activador, donde el activador es capaz de activar la expresión en un locus respondedor; y (ii) un locus respondedor, que comprende un gen tóxico que se expresa únicamente en presencia del activador; (b) introducir una célula de ratón donante en el embrión hospedador de la etapa (a); y (c) gestar el embrión de la etapa (b) en una hembra de ratón seudopreñada.

En un aspecto, el locus activador comprende una secuencia que codifica una proteína activadora. En un aspecto, el locus respondedor comprende una secuencia que codifica una proteína respondedora.

En un aspecto, el gen tóxico se expresa únicamente en presencia del activador, y el gen activador se expresa en una fase durante la que se expresa el gen Nanog, y donde el gen activador no se expresa en el trofotodermo.

En un aspecto, se describe en este documento un método para generar un ratón, que comprende (a) proporcionar un embrión de ratón hospedador, donde el embrión de ratón hospedador comprende una ICM, y donde las células de la ICM comprenden un gen tóxico y un gen activador, donde la expresión del gen activador está controlada por un promotor regulado por el desarrollo que es activo durante el estadio de blastocisto en células de la ICM, pero no del trofotodermo; (b) introducir una célula ES donante en el embrión hospedador; y (c) introducir el embrión hospedador que comprende la célula ES donante en un ratón en condiciones adecuadas para gestar el embrión hospedador que comprende la célula ES donante; y (d) permitir que el embrión hospedador que comprende la célula ES donante se desarrolle en un ratón.

En un aspecto, se describe en este documento un método para generar un ratón, que comprende (a) introducir en un blastocisto hospedador de ratón diploide una célula ES o PS donante de ratón, donde el blastocisto hospedador comprende una ICM, y donde las células de la ICM hospedadora son incapaces de proliferar; y (b) permitir que el blastocisto de (a) que comprende la célula ES o PS donante de ratón se desarrolle en un ratón en una hembra de ratón seudopreñada.

En un aspecto, los métodos y composiciones descritos en este documento se emplean para generar un ratón o un embrión de ratón introduciendo una o más células de ratón donantes en un embrión hospedador de ratón, donde todos los tejidos del ratón o embrión de ratón que se genera derivan menos de un 90 % de las células donantes, derivan menos de un 95 % de las células donantes, derivan menos de un 98 % de las células donantes, derivan menos de un 99 % de las células donantes o derivan un 100 % de las células donantes.

En un aspecto, los métodos y composiciones descritos en este documento se emplean para generar un ratón o un embrión de ratón introduciendo una o más células donantes en un embrión hospedador de ratón, y gestando el embrión para formar un ratón resultante, donde el ratón resultante deriva no más de un 3 % del embrión hospedador, deriva no más de un 2 % del embrión hospedar, deriva no más de un 1 % del embrión hospedador, deriva no más de un 0,5 % del embrión hospedador, deriva no más de un 0,2 % del embrión hospedador, deriva no más de un 0,1 % del embrión hospedador, deriva no más de un 0,05 % del embrión hospedador.

En un aspecto, se describen en este documento métodos y composiciones para generar una descendencia de ratón derivada de una célula donante, que comprende introducir una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince o dieciséis células en un embrión hospedador que es un óvulo fertilizado o está en un estadio de 2 células, 4 células, 8 células, 16 células, 32 células o un blastocisto; introducir el embrión en un ratón que es capaz de gestar el embrión, donde la descendencia del ratón deriva en no más de un 0,2 % o un 0,1 % del embrión hospedador. En un aspecto, el embrión hospedador es un blastocito y el número de células donantes es 12-16 células. En un aspecto, el embrión hospedador está en el estadio de 8 células, o una fase anterior y el número de células donantes es 1-10, en un aspecto específico 2-10 células.

En un aspecto, se describe en este documento un método que emplea cualquier combinación de las composiciones y/o métodos descritos en este documento para generar un ratón a partir de una célula ES o PS donante y un embrión hospedador, donde el ratón está en la generación F0 y deriva un 99,8 %, un 99,9 % o un 100 % de la célula ES o PS donante. En un aspecto específico, la célula donante es una célula ES o PS, el embrión es diploide y está en un estadio de blastocisto, donde el blastocisto comprende una ICM, y donde las células de la ICM se eliminan o son incapaces de proliferar debido a la expresión de un gen tóxico, y donde la célula donante se introduce en el embrión diploide en una fase seleccionada de un estadio de 2 células, un estadio de 4 células, un estadio de 8 células, un estadio de 16 células, un estadio de 32 células y un estadio de blastocisto.

En un aspecto, se describe en este documento un embrión hospedador de ratón, donde el embrión hospedador de ratón comprende una ICM y un trofotodermo, donde las células de la ICM son incapaces de proliferar y donde las células de la ICM expresan un gen que es tóxico para las células ICM, y donde las células del trofotodermo no expresan el gen. En un aspecto, el gen que es tóxico para las células ICM codifica una proteína que es tóxica para las células ICM. En otro aspecto, el gen que es tóxico para las células ICM expresa un micro-ARN que es tóxico para las células ICM. En un aspecto, el embrión hospedador de ratón comprende además una célula donante de ratón

seleccionada de una célula ES y una célula PS. En un aspecto específico, el embrión hospedador de ratón es diploide.

5 En un aspecto, se describe en este documento un embrión hospedador de ratón, donde el embrión carece de una ICM que deriva del embrión hospedador de ratón.

10 En un aspecto, se describe en este documento un embrión hospedador de ratón, donde el embrión hospedador comprende una ICM que no es capaz de proliferar, donde el embrión es capaz de recibir células donantes y desarrollarse en un ratón derivado de las células donantes.

15 En un aspecto, se describe en este documento un embrión hospedador de ratón, donde el embrión hospedador comprende células ICM derivadas del hospedador y células ICM derivadas de un donante, donde las células ICM derivadas del hospedador son incapaces de contribuir al desarrollo del embrión.

20 En un aspecto, se describe en este documento un embrión hospedador de ratón, donde el embrión hospedador comprende una ICM, donde todas las células viables de la ICM derivan de un ratón donante.

25 En un aspecto, se describe en este documento un embrión, donde el embrión comprende una modificación genética que hace que la ICM sea incapaz de contribuir al desarrollo del embrión en un animal nacido vivo. En un aspecto, la modificación genética que hace que la ICM sea incapaz de contribuir al desarrollo del embrión es una modificación de un gen cuya transcripción es esencial para la embriogénesis. En un aspecto, la modificación genética comprende una mutación heterocigótica u homocigótica en un gen Ronin, un gen Nanog, un gen Oct3/4, un gen Sox2, un gen Klf4, un gen a Fgf4, un gen Rex1, un gen Cripto, un gen Dax, un gen Esg1, un gen Nat1 y un gen Fbx15. En un aspecto específico, la modificación genética comprende una inactivación del gen Ronin de una inactivación de al menos uno de los genes mencionados anteriormente. En un aspecto específico, la modificación genética es una inactivación condicionada.

30 En un aspecto, un método para generar un ratón derivado en su totalidad o una parte sustancial de una célula donante, que comprende introducir una célula donante en un embrión de ratón, donde el embrión de ratón es sustancialmente incapaz de expresar una proteína Ronin funcional. En un aspecto, la célula donante se selecciona de una célula ES, una célula PS y una célula iPS. En un aspecto, la célula donante comprende una modificación genética.

35 Cualquiera de los aspectos y realizaciones descritos en este documento puede combinarse con cualquier otro aspecto o realización salvo que esté claro a partir del contexto que el aspecto o realización es incompatible con otro aspecto o realización.

Otros objetivos y ventajas llegarán a ser evidente a partir de una revisión de la consiguiente descripción detallada.

40 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 es una representación esquemática de una construcción de ADN (una construcción activadora) que contiene un gen de recombinasa útil en una realización de la invención. "UTR 5'" se refiere a la parte del gen Nanog de ratón que codifica la parte no traducida en el extremo 5' del ARN mensajero (ARNm) de Nanog. "Exón 1 de Nanog" se refiere a la parte del gen Nanog que codifica el primer exón del ARNm precursor de Nanog; "2.º ATG" se refiere a la parte del gen Nanog que codifica el segundo codón AUG en fase en el ARNm de Nanog. La secuencia codificante de la proteína Nanog en el clon BAC de ratón 359m22 (Incyte Genomics BAC biblioteca 129/SvJ emisión 2) se eliminó del ATG en una posición en la UTR 3'. "FRT" en cada caso se refiere a un sitio de reconocimiento de recombinasa Fip. "PGK-EM7-neo" se refiere a una secuencia codificante de neomicina fosfotransferasa unida de forma funcional al promotor del gen Pgf1 de ratón, para su expresión en células de mamífero, y a un promotor EM7, para su expresión en células bacterianas. "NL-Cre" se refiere a la secuencia codificante de proteína de la recombinasa Cre marcada de forma N-terminal con una señal de localización nuclear. El término "p(A)" o "poliA" se refiere a secuencias de ácido nucleico que señalizan la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. la indicación "flanco 5' de Nanog de ~70 kb" y "flanco 3'" se refiere a secuencias en el clon BAC que flanquean la secuencia codificante de la proteína Nanog. Las longitudes de secuencia no están dibujadas a escala.

La figura 2 es una representación esquemática de una construcción de ADN (una construcción respondedora) que contiene un gen tóxico útil en una realización de la invención, donde el gen tóxico puede expresarse únicamente tras la exposición de la construcción de ADN integrada a una recombinasa Cre. Los brazos de homología ("2,4 kb Rosa HA 5'" y "2,8 kb Rosa HA 3'") para el locus de ratón Gt(ROSA)26Sor se muestran flanqueando la construcción. La construcción incluye, de 5' a 3' con respecto al ARN transcrito, un punto de ramificación intrónica, un tramo de polipirimidina y un sitio de corte y empalme 3' (marcado "aceptor de corte y empalme"), un sitio loxP, un promotor EM7, una secuencia codificante de neomicina fosfotransferasa (neo^r), una señal para la terminación de la transcripción y poliadenilación del ARNm del gen Pgf1 de ratón (PGKp(A)), seguida por un sitio loxP, una secuencia que codifica el fragmento de la toxina diftérica A (DTA), seguida por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y una secuencia que codifica la proteína fluorescente verde

potenciada (eGFP), seguida por una señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación del ARNm del gen de la β -globina una (β -gl p(A)). Las longitudes de secuencia no están dibujadas a escala.

La figura 3 muestra los resultados de genotipado para grupos de control (dos conjuntos) que reflejan microinyecciones de 2 y 4 células ES de ratón donantes en embriones de ratón en el estadio de 8 células. Los alelos presentes en el embrión hospedador son Rosa-DTA (Rosa26-loxP-neo-poli(A)-loxP-DTA-IRES-eGFP, alelo marcado en el locus Rosa26) o Nanog Cre (Nanog-Cre-poli(A)-PGKp-neo-poli(A), alelo de inserción aleatoria de un BAC modificado con Nanog); la célula ES microinyectada porta un alelo condicionado COIN inverso (eGFP-poli(A)-hUbCp-neo-poli(A), insertado en el gen Il2rg ligado al X). "Ratón" se refiere a una denominación arbitraria de un ratón individual.

La figura 4 muestra los resultados de genotipado para un grupo experimental (un conjunto) que reflejan microinyecciones de 2 y 4 células ES de ratón donantes en embriones de ratón en el estadio de 8 células. Los embriones hospedadores portan tanto los alelos, Rosa-DTA como los alelos Nanog-Cre.

Descripción detallada

La invención, en su sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes.

Antes de describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que la invención no está limitada a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar.

También se debe entender que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento incluyen los mismos significados habitualmente comprendidos por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales específicos.

En este documento se describen animales modificados genéticamente, así como embriones no humanos derivados en su totalidad o en parte de células donantes no humanas. Se describen en este documento métodos y composiciones para generar un embrión no humano o un animal no humano a partir de un embrión hospedador y una célula donante.

Los métodos incluyen introducir una célula donante no humana en un embrión hospedador no humano, hacer crecer el embrión hospedador en un animal en condiciones adecuadas para la gestación y obtener un embrión o un animal que tiene una contribución genética de la célula donante. En diversos aspectos, el método incluye generar animales que derivan sustancial o completamente de la célula donante (por ejemplo, una célula ES) introduciendo la célula donante en un embrión (por ejemplo, una premórula, mórula o blastocisto). Aunque diversos aspectos pueden ponerse en práctica usando la tecnología de embriones tetraploides, los métodos descritos en este documento no requieren el uso de la tecnología de embriones tetraploides. Aunque pueden ponerse en práctica diversos aspectos empleando embriones en el estadio de 4 y 8 células, los métodos descritos en este documento también incluyen métodos para introducir células donantes en otras fases, por ejemplo, en un estadio de blastocisto.

También se describen en este documento métodos y composiciones para generar ratones o embriones que derivan sustancial o completamente de la célula donante, introduciendo la célula donante en un embrión que es, por ejemplo, un embrión en el estadio de 2 células, un embrión en el estadio de 4 células, un embrión en el estadio de 8 células, un embrión en el estadio de 16 células, una premórula, una mórula, una mórula no compactada, una mórula compactada, un blastocisto, que carece o que carece sustancialmente de un endodermo primitivo, o un blastocisto que comprende un endodermo primitivo.

Se describen en este documento métodos y composiciones para generar embriones hospedadores no humanos que carecen de una ICM viable o una ICM capaz de desarrollarse en un embrión o un animal nacido vivo, o para generar embriones hospedadores no humanos que comprenden una ICM que es incapaz de proliferar, y para usar dichos embriones como hospedadores para generar embriones o animales no humanos derivados completamente o en parte de una célula donante introduciendo la célula donante en el embrión hospedador y haciendo crecer el embrión en condiciones adecuadas para el desarrollo del embrión.

Aunque la presente divulgación también puede emplearse con la tecnología de embriones tetraploides, o con un método que comprende introducir las células donantes en un estadio de premórula, los métodos son adecuados, por ejemplo, para su uso con células donantes y embriones sin emplear fusiones tetraploides y en un estadio de premórula, mórula o posmórula tal como, por ejemplo, en el estadio de blastocisto. Las células donantes adecuadas incluyen, por ejemplo, células ES. Las células donantes adecuadas también incluyen células PS, por ejemplo, células iPS y cualquier otra célula adecuada que sea capaz de poblar un embrión.

Los métodos incluyen emplear un embrión hospedador que está modificado (física, química o genéticamente) para reducir la capacidad de las células de la ICM del embrión hospedador de proliferar o poblar el embrión. En diversos

aspectos, la ICM del embrión hospedador queda incapaz de contribuir, de forma eficaz, al desarrollo del embrión. Esto proporciona a las células donantes una ventaja competitiva en la colonización del embrión hospedador, incluso cuando la célula donante se introduce en una fase relativamente tardía (por ejemplo, en un estadio de mórula, posmórula o blastocisto). En diversos aspectos, se describen en este documento métodos y composiciones para

- 5 generar un ratón que deriva sustancial o completamente de la célula donante (es decir, con poca o ninguna contribución de las células hospedadoras) en la generación F0. En diversos aspectos, se genera un ratón que deriva sustancial o completamente de una célula donante, sin emplear la tecnología de embriones tetraploides y sin la necesidad de introducir células donantes en un estadio de premórula.
- 10 En diversos aspectos, una célula ICM es "sustancialmente incapaz de proliferar" o una célula ICM que tiene capacidad reducida de proliferar o poblar un embrión es una célula ICM que está modificada genéticamente para que sea incapaz de competir de forma eficaz con una célula donante para poblar un embrión o contribuir a los tejidos de un animal que se desarrolla a partir del embrión. En diversos aspectos, dichas células ICM incluyen aquellas que son incapaces de sobrevivir durante una cantidad de tiempo suficiente para reproducirse, son incapaces de reproducirse a una velocidad que permita que las células ICM derivadas del hospedador compitan de forma eficaz con una célula donante o están modificadas para expresar de forma condicionada un gen tóxico para la célula (por ejemplo, un gen que codifica un ARN tóxico o proteína tóxica) que elimina la célula ICM derivada de hospedador en un punto del desarrollo del embrión donde la muerte de las células del linaje de la ICM hospedadora no daría lugar de forma inevitable a muerte o fallecimiento o reabsorción de un embrión en que se introducen las células donantes
- 20 viables capaces de poblar el embrión.

Los embriones de ratón en fase temprana, tales como blastocisto (por ejemplo, un embrión en estadio de 64 células) comprenden dos tipos principales de células - células que forman un trofotodermo y células que forman la ICM. El trofotodermo es una estructura esencialmente del tipo de una bola hueca que proporciona protección y mantenimiento a las células de la ICM, que están contenidas por el trofotodermo.

- 25 Durante el desarrollo temprano del embrión de ratón, las células de la ICM se asocian con una cavidad rellena de líquido (un blastocelo) también contenido por el trofotodermo. Las células de trofotodermo finalmente no dan lugar a los componentes del ratón resultante, y forman, en su lugar, los tejidos extraembrionarios (por ejemplo, la placenta y el saco vitelino). En contraste, las células ICM dentro del trofotodermo dan lugar a todos los tipos de células y tejidos del ratón resultante. Los métodos y composiciones descritos en este documento incluyen métodos y composiciones que explotan esta diferencia en la composición del embrión de ratón, y en diversos aspectos están dirigidos a eliminar las células ICM del embrión hospedador en su totalidad o en parte, e introducir una célula donante para poblar el embrión hospedador para desarrollar un animal que deriva de la célula donante, incluyendo animales derivados en su totalidad o en parte sustancial de la célula donante. En un aspecto específico, todas o sustancialmente todas las células del animal resultante derivan de la célula donante. En diversos aspectos, la célula donante comprende una modificación genética, por ejemplo, una mutación, eliminación o inserción de un gen o fragmento génico, y es homocigótica o heterocigótica para la modificación.

- 40 Sin el deseo de limitar las reivindicaciones por la teoría, una visión es que al menos algunas de las células de una ICM pueden contribuir a la formación de un endodermo primitivo en un blastocisto, así como al epiblasto. En esta visión, las proteínas o genes que son tóxicos para las células hospedadoras (por ejemplo, tóxicos para la ICM del embrión hospedador), podrían provocar la destrucción del endodermo primitivo del blastocisto antes de que las células donantes hayan proliferado y/o se hayan diferenciado suficientemente para contribuir al endodermo primitivo.
- 45 En esta visión, sería ventajoso cuando se emplea un blastocisto como embrión hospedador para seleccionar un blastocisto en una fase donde el endodermo primitivo aún no se haya formado, o esté en el proceso de formación, para introducir las células donantes deseadas (por ejemplo, las células ES o células pluripotentes). En esta visión, las células donantes tendrían una oportunidad de participar en la formación del endodermo primitivo y aumentar las posibilidades de que el embrión resultante llegue a término. Por tanto, en algunos aspectos, las células donantes se introducen en una fase anterior a la formación del endodermo primitivo, o en una fase anterior a la formación sustancial del endodermo primitivo.

- 50 Se incluyen métodos y composiciones de acuerdo con la presente divulgación en el siguiente análisis de los aspectos específicos, que se proporcionan como ejemplos. En el siguiente análisis, se generan dos ratones modificados genéticamente: (1) un primer ratón activador, que comprende un gen que codifica un activador (en un primer aspecto, una recombinasa) cuya expresión está dirigida por un promotor regulado por el desarrollo (en un aspecto específico, un promotor que dirige la expresión de un gen en una fase en la que el promotor Nanog dirige la expresión, es decir en una fase en la que se transcribe el gen Nanog) y (2) un segundo ratón modificado genéticamente (un ratón respondedor) que comprende un gen que es tóxico para una célula (por ejemplo, un gen que codifica una proteína tóxica para una célula; en un aspecto específico un gen DTA) en una construcción colocada en un locus que permite la expresión (en un aspecto específico, el locus Gt(ROSA)26Sor), donde el gen tóxico no se expresa hasta que se activa una secuencia localizada entre la secuencia codificada del gen tóxico y el promotor y que evita la expresión del gen tóxico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico intermedia; en un aspecto específico, el casete neo^r-gen-poli(A) floxeado) por el activador (por ejemplo, por la acción de una recombinasa específica de sitio; en una realización específica, Cre).
- 65

Los ratones generados de acuerdo con el párrafo anterior (por ejemplo, un ratón activador y un ratón respondedor) se cruzan posteriormente. Si tanto el ratón respondedor como el ratón activador son homocigóticos para sus alelos respectivos, el cruce no producirá descendencia viva. Si los ratones son cada uno heterocigóticos, entonces únicamente los embriones que tengan ambos alelos (es decir, el alelo activador y el respondedor) no sobrevivirán.

5 La expresión del activador del primer ratón modificado genéticamente (el ratón activador) activará el gen tóxico del segundo ratón modificado genéticamente (el ratón respondedor). El activador se expresará, y se producirá la activación, y se producirá en un punto en el desarrollo del embrión que corresponde con la activación del promotor regulado por el desarrollo. El activador expresado actuará sobre la secuencia que evita la expresión del gen tóxico, permitiendo de este modo que el gen tóxico llegue a expresarse.

10 Tras la expresión del gen tóxico, las células de la ICM no lograrán prosperar, no lograrán proliferar, no lograrán ser capaces de competir de forma eficaz con las células donantes y/o morirán como resultado final de la expresión del gen tóxico. Como las células ICM no pueden prosperar, proliferar, competir con las células donantes y/o sobrevivir, no se formará descendencia derivada de la ICM del embrión hospedador. En su lugar, las células donantes (en un aspecto específico, las células ES donantes de ratón; que comprenden una modificación genética, si se desea) que se introducen en el embrión, donde las células donantes carecen del activador y/o el respondedor (por ejemplo, carecen del gen tóxico y/o de la capacidad de expresarlo), pueden introducirse para poblar el embrión hospedador. Como las células donantes no generan el gen tóxico, las células donantes son capaces de poblar el embrión y desarrollarse en un embrión más avanzado y, en las circunstancias apropiadas, una descendencia del ratón. En algunos aspectos, la descendencia del ratón deriva completamente de la célula donante y puede comprender cualquier modificación genética deseable, donde el ratón puede ser, por ejemplo, heterocigótico u homocigótico para la modificación genética, según se desee.

25 El ratón modificado genéticamente que comprende el gen para el activador dirigido por el promotor regulado por el desarrollo puede generarse colocando un gen activador (con o sin un promotor) en cualquier locus adecuado en el genoma por cualquier método conocido para los expertos en la materia. La colocación de la construcción de ácido nucleico que comprende el gen activador puede hacerse por cualquier método adecuado, por ejemplo, recombinación homóloga o integración aleatoria. La presente divulgación no está limitada por ningún método particular para introducir el gen activador, y no está limitada a la colocación en ningún locus específico.

30 Asimismo, un ratón modificado genéticamente que comprende un gen respondedor en, por ejemplo, una construcción sin promotor colocada en un locus que permite la expresión puede generarse, por ejemplo, introduciendo una construcción de ácido nucleico que comprende el gen respondedor (por ejemplo, una secuencia codificante de DTA) y cualquier secuencia que evite la expresión del gen respondedor (por ejemplo, un marcador y/o señal de terminación de la transcripción flanqueada en ambos lados por sitios de reconocimiento de recombinasa específica de sitio) en un genoma en cualquier locus adecuado en el genoma por cualquier método conocido para los expertos en la materia.

40 La presente divulgación no está limitada a ningún método particular para introducir la construcción que comprende el gen respondedor, y no está limitada a colocar la construcción que comprende el gen respondedor en ningún locus específico. Aunque los ejemplos divulgados no analizados en este documento emplean una construcción dirigida que comprende brazos de homología correspondientes al locus Gt(ROSA)26Sor, la integración puede proseguir por recombinación homóloga en un sitio diana (por ejemplo, el locus Gt(ROSA)26Sor) o por integración aleatoria en cualquier locus adecuado que permite la expresión. Todo lo que se requiere es que, tras la expresión del gen activador (por ejemplo, la expresión de una recombinasa), se exprese el gen tóxico del respondedor.

50 Un locus que permite la expresión de acuerdo con la presente divulgación se refiere a un locus dentro de un genoma que no impide la expresión del gen respondedor. Un locus que permite la expresión incluye un locus que se selecciona empleando una construcción que inserta de forma aleatoria el gen respondedor en el genoma. Por ejemplo, una construcción que comprende el gen respondedor y un gen marcador adyacente al gen respondedor se introduce en un genoma y la expresión del marcador (por ejemplo, un gen de resistencia a fármaco) es una indicación de que la integración se ha producido en un locus que permite la expresión.

55 En otro ejemplo, el gen respondedor puede introducirse en una construcción que contiene brazos de secuencia que son homólogos a un locus preseleccionado o específico que se sabe que permite o es sospechoso de permitir la expresión (por ejemplo, una construcción que comprende un gen tóxico y brazos de homología que dirigen la construcción al locus preseleccionado o específico).

60 En diversos aspectos, la selección del locus que permite la expresión puede facilitarse en algunos casos incluyendo un marcador sin promotor (es decir, que carece de un promotor que es activo en el tipo de célula en que se coloca la construcción) en la construcción que comprende el gen respondedor (por ejemplo, adyacente al gen respondedor). En dicho caso, las células pueden cribarse observando la expresión del marcador, asegurando que el locus sea permisivo con respecto a la expresión del marcador. En diversos aspectos, la eliminación del marcador (y cualquier secuencia o secuencias tales como, por ejemplo, una secuencia de terminación de la transcripción después del marcador) puede ser un evento que permita que el locus que permite la expresión dirija la expresión del gen respondedor, ya que en dicho aspecto, el gen respondedor tras la escisión del marcador y cualquier secuencia

asociada (por ejemplo, una secuencia de terminación de la transcripción) queda unido de forma funcional a un promotor. En diversos aspectos, el promotor puede estar presente en un brazo de homología que dirige una construcción que contiene el gen respondedor a un locus específico o preseleccionado. En diversas realizaciones, puede emplearse una secuencia que codifica un sitio aceptor de corte y empalme en la construcción respondedora, localizado, por ejemplo, 5' con respecto al transcrito del gen tóxico, para ayudar a la unión funcional del gen tóxico a un promotor tras, por ejemplo, la escisión del gen marcador y cualquier secuencia asociada.

En diversos aspectos, puede introducirse un gen respondedor en un genoma usando una construcción que comprende una secuencia que es capaz de dirigir la expresión del gen respondedor tras la expresión de un gen activador. En un aspecto específico, se coloca un promotor 5' con respecto a un transcrito del gen marcador, estando seguido el marcador por una secuencia de terminación de la transcripción, que está seguida por el gen respondedor. En estos aspectos, la construcción que comprende el gen respondedor se puede colocar en cualquier parte en un genoma en que el promotor no está silenciado. En esta ocasión el locus que permite la expresión es un locus que no silencia el promotor de la construcción que comprende el gen respondedor.

Por ejemplo, el gen tóxico puede colocarse en el genoma en una construcción de ácido nucleico que comprende un promotor unido de forma funcional a, por ejemplo, una secuencia loxP-marcador-poli(A)-loxP. En dicha situación, el promotor se introduce en el genoma con el gen tóxico y una secuencia intermedia (loxP-marcador-poli(A)-loxP) entre el gen tóxico y el promotor, donde la secuencia intermedia evita la expresión del gen tóxico hasta que se active por una recombinasa Cre. Una vez activado por la recombinasa Cre, la secuencia intermedia loxP-marcador-poli(A)-loxP se escinde, colocando el promotor en unión funcional con el gen tóxico, que posibilita la expresión del gen tóxico. En dicho aspecto, el locus permite la expresión porque no silencia la expresión del gen marcador antes de la acción de la recombinasa, y no silencia la expresión del gen tóxico una vez que el gen tóxico ha quedado unido de forma funcional al promotor por la acción de la recombinasa.

El promotor regulado por el desarrollo que dirige la expresión del gen activador incluye un promotor seleccionado de modo que no se active, es decir, que no dirija la expresión de un gen unido de forma funcional al mismo, hasta que el desarrollo del embrión hospedador esté en una fase deseada (o preseleccionada). En diversos aspectos, el promotor no es activo en el trofotodermo (por ejemplo, es un promotor para un gen que no se transcribe en el trofotodermo en condiciones naturales en un embrión de ratón normal), y la fase del desarrollo es una en que el trofotodermo está presente, pero antes de la gastrulación (por ejemplo, estadio de blastocisto), o en un estadio de preblastocisto. De esta manera, y en estos aspectos, por ejemplo, el activador que está unido de forma funcional al promotor se expresa no antes del estadio de mórula, pero se expresa no después de la gastrulación. Por tanto, en un aspecto, un promotor "regulado por el desarrollo" del gen activador incluye un promotor que dirige la expresión de un gen unido de forma funcional al mismo no antes del estadio de mórula. En otro aspecto, un gen activador "regulado por el desarrollo" dirige la expresión no antes del estadio de mórula y no dirige la expresión en y/o después de la gastrulación. En los ejemplos específicos proporcionados, un promotor de un gen Nanog de ratón está contenido en la construcción de ADN que introduce el gen activador (en esta ocasión, que codifica un gen de recombinasa Cre) en un genoma para generar un ratón activador, aunque es adecuado cualquier promotor que tenga, o pueda modificarse para que tenga las propiedades analizadas.

Debe apreciarse que, en los ejemplos proporcionados en este documento, la construcción de ADN que contiene el gen Cre flanqueado en ambos lados por secuencias Nanog (véase la figura 1) no tiene necesariamente que insertarse en un locus Nanog en el genoma del ratón para que la realización de la invención funcione según se desea. En los ejemplos proporcionados en este documento, ambos alelos Nanog que se producen de forma natural en el ratón de tipo silvestre estaban presentes, como se midió por PCR cuantitativa (datos no mostrados) en el ratón modificado genéticamente por la construcción de ADN de la figura 1, así como el Nanog introducido por la construcción de ADN de la figura 1.

En diversos aspectos, el promotor regulado por el desarrollo es un promotor activo únicamente en la embriogénesis de fase temprana (por ejemplo, es un promotor para un gen transcrito únicamente en la embriogénesis de fase temprana), tal como en embriones en estadio de mórula y blastocisto (Chambers *et al.* (2003) Cell, 113:643-655) y generalmente se expresa únicamente en las células de la ICM. Se emplea un promotor regulado por el desarrollo de modo que un gen activador al que puede unirse de forma funcional el promotor (por ejemplo, cuando el gen activador codifica una recombinasa, por ejemplo, Cre, Flp, etc.) se exprese únicamente cuando dicho promotor regulado por el desarrollo sea activo, es decir, durante el desarrollo temprano del embrión y, por ejemplo, especialmente cuando se está formando la ICM.

Una ventaja del promotor Nanog es que no es activo en el trofotodermo, lo que es ventajoso porque las construcciones descritas en este documento no dan lugar a la muerte de las células del trofotodermo por la expresión del gen activador (por ejemplo, Cre) en células del trofotodermo y la expresión concomitante del gen respondedor (por ejemplo, debido a la escisión de una secuencia adyacente al gen respondedor, por ejemplo, un gen de DTA, que evita la expresión del respondedor).

En diversos aspectos, el activador comprende una proteína que es capaz de activar un promotor de modo que un gen unido de forma funcional al promotor tiene capacidad de expresión desde el promotor en presencia de la

proteína activadora. En diversos aspectos, la proteína activadora comprende un represor modificado, donde el represor modificado es capaz de activar la expresión desde un promotor, tal como, por ejemplo, el represor de tet modificado que funciona en un sistema de expresión de activación/desactivación de tet. Otros aspectos incluyen un sistema dependiente de Dox y un sistema dependiente de rapamicina.

5 En diversos aspectos, el gen activador codifica una recombinasa específica de sitio. La recombinasa puede ser una recombinasa que no se expresa de forma natural en la célula o embrión. En diversos aspectos, se emplea una recombinasa que no es activa en el ratón de tipo silvestre normal en la fase del desarrollo en la que el promotor regulado por el desarrollo dirige la expresión, o está ausente de un ratón de tipo silvestre.

10 En diversos aspectos, cuando el gen activador codifica una recombinasa específica de sitio, puede emplearse cualquier sitio de reconocimiento de recombinación específica de sitio adecuado para flanquear (por ejemplo, en ambos lados) una secuencia que evita la expresión del gen respondedor. El sitio de recombinasa específica de sitio puede ser un sitio loxP, o variantes del mismo (reconocido por la recombinasa Cre o una recombinasa Cre modificada), un sitio FRT o variantes del mismo (reconocido por la recombinasa Flp o una recombinasa Flp modificada), o cualquier otro sitio de reconocimiento de recombinasa adecuado. Si los sitios de reconocimiento de recombinasa se colocan en la misma orientación definida por su región central asimétrica, las secuencias intermedias (es decir, secuencias localizadas entre los sitios de reconocimiento de recombinasa) se escinden después de la exposición a la recombinasa apropiada. Si los sitios de reconocimiento de recombinasa se colocan en la orientación opuesta con respecto uno del otro definida por su región central asimétrica, las secuencias intermedias están invertidas después de la exposición a la recombinasa adecuada.

25 Puede usarse una diversidad de marcadores por los métodos y composiciones descritos en este documento. Los marcadores adecuados incluyen marcadores de selección que funcionan tanto junto con un casete protector como con un marcador de selección para identificar los eventos de integración de la construcción en el genoma de la célula donante. Los marcadores de selección pueden ser cualquier marcador conocido en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, un gen de resistencia a fármacos, tal como un gen para, por ejemplo, neomicina fosfotransferasa (*neo^r*), higromicina B fosfotransferasa (*hyg^r*), puromicina-N-acetiltransferasa (*puro^r*), blasticidina S desaminasa (*bsr^r*), xantina/guanina fosforribosil transferasa (*gpt*), timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tk) y fusiones de tk con *neo^r*, *hyg^r* o *puro^r*, o genes indicadores tales como, por ejemplo, proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), GFP potenciada (eGFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), YFP potenciada (eYFP), proteína fluorescente azul (BFP), BFP potenciada (eBFP), proteína fluorescente roja del coral *Discosoma* (DsRed), MmGFP (Zernicka-Goetz *et al.* (1997) *Development* 124:1133-1137) u otros conocidos para los expertos en la materia. Los agentes de selección adecuados para los genes de resistencia a fármacos incluyen G418 (con *neo^r*), puromicina (con *puro^r*), higromicina B (con *hyg^r*), blasticidina S (con *bsr^r*), ácido micofenólico y 6-tio(guanina) (con *gpt*) y ganciclovir o 1(2'-deoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo (FIAU) (con HSV-tk).

40 El gen tóxico puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que codifique un producto que en solitario o en combinación con otro agente de lugar al fracaso en prosperar, fracaso en proliferación, fracaso de las células ICM hospedadoras de competir con las células donantes o muerte de la célula que expresa el gen tóxico. Un gen tóxico puede codificar una proteína (por ejemplo, puede ser un ADNc que codifica una toxina) o puede codificar un micro-ARN que es perjudicial para la ICM. Los genes tóxicos preferidos incluyen, aunque sin limitación, los genes para DTA (Matsumura *et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321:275-279), DTA atenuado, tox-176 (Drago *et al.* (1998) *J Neuroscience* 18:9845-9857), timidina cinasa del virus del herpes simple 1 (HSV-tk), PE40 (Saito *et al.* (1994) *Cancer Res.* 54:1059-1064), ricina y cualquier otro gen tóxico adecuado conocido para los expertos en la materia. Los fragmentos tóxicamente eficaces de los genes tóxicos también son adecuados. En diversos aspectos, el gen tóxico no debe dar lugar sustancialmente al fracaso en prosperar, fracaso en proliferar o muerte de las células que no expresan el gen tóxico.

50 **Un ratón modificado genéticamente que tiene una recombinasa unida de forma funcional a un promotor regulado por el desarrollo**

55 Un ratón modificado genéticamente que tiene un gen activador (por ejemplo, un gen que codifica una recombinasa) que se insertó en el genoma de ratón usando una construcción de ADN que tiene secuencias de un promotor regulado por el desarrollo, y se expresa de una manera regulada por el desarrollo (por ejemplo, como se expresa Nanog) se empleó como cepa activadora. Dicha cepa activadora que tiene un gen que codifica una proteína activadora (en el ejemplo, una recombinasa Cre) que se expresa de una manera regulada por el desarrollo se generó y se usó para cruzarse con una segunda cepa de ratón, una cepa respondedora (descrita a continuación). La cepa que tiene el activador se denominó la cepa "Nanog-Cre Tg".

65 La cepa Nanog-Cre Tg se generó como se describe en el ejemplo 1. Una construcción de ADN que comprende secuencias del promotor Nanog y un gen de recombinasa Cre se generó y se introdujo en una célula ES de ratón, que se usó como se describe para generar un ratón Nanog-Cre homocigótico. La construcción de ADN contenía secuencias del gen Nanog que codifica la UTR 5' completa y parte de la UTR 3' como se describe en el ejemplo 1, y la secuencia que codifica la UTR 5' estaba seguida por la secuencia que codifica la proteína Nanog desde el primer

codón de metionina hasta el segundo codón de metionina en fase (indicado como "2.º ATG" en la secuencia de ADN en el diagrama de la figura 1). Unida a la secuencia codificante de la proteína Nanog había una secuencia que codifica la recombinasa Cre con una señal de localización nuclear. La construcción también contenía un casete del marcador de resistencia a neomicina flanqueado por FRT (flanqueado en ambos lados) que contenía un promotor para la expresión y la selección por G418 en eucariotas (promotor PGK) y un promotor para la expresión y la selección en procariontes (promotor EM7) y una secuencia que codifica una señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación.

Como se describe en los ejemplos, el ratón Nanog-Cre Tg producía ratones viables tras el cruce que eran homocigóticos para la modificación Nanog-Cre, lo que establece de forma eficaz una cepa de ratones que tiene un gen de recombinasa (es decir, un gen activador) expresado de una manera regulada por el desarrollo (es decir, en el embrión en o durante la formación de la ICM) y en el desarrollo de pliegues genitales. La PCR cuantitativa demostró que ambos alelos nativos del gen Nanog estaban presentes (datos no mostrados) y una única copia de la construcción Nanog-Cre se había insertado en otra parte en el genoma. No obstante, la recombinasa se expresó de una manera coherente con el patrón de desarrollo de la expresión de Nanog, medida por la expresión de Cre dirigida por el promotor Nanog en células ES.

Un ratón modificado genéticamente que tiene un gen tóxico en un locus que permite la expresión

Un ratón modificado genéticamente que tiene un gen tóxico en un locus que permite la expresión, donde la expresión del gen tóxico requiere la expresión de un gen activador, se empleó como cepa respondedora. El gen tóxico no se expresa en la cepa respondedora, porque la cepa respondedora no porta un gen activador. Se generó dicha cepa respondedora, que tiene un gen que codifica una proteína tóxica (en el ejemplo, DTA) precedida por una secuencia que evita su expresión en ausencia de una proteína activadora (en el ejemplo, una secuencia neo^r-poli(A) floxeada), la construcción flanqueada por los brazos de homología con un locus que permite la expresión (en el ejemplo un locus Gt(ROSA)26Sor). La cepa respondedora se denominó la cepa "ROSA-floxeada-STOP-DTA".

La cepa ROSA-floxeada-STOP-DTA se generó como se describe en los ejemplos. Se generó una construcción de ADN que comprende una secuencia de relleno floxeada (una secuencia neo^r-poli(A) floxeada) adyacente a una secuencia codificante de DTA que tiene brazos de homología con el locus Gt(ROSA)26Sor de ratón y se introdujo en una célula ES de ratón, que se usó como se describe para generar un ratón ROSA-floxeada-STOP-DTA homocigótico. Como se muestra en la figura 2, la construcción de ADN contenía, de 5' a 3', con respecto al transcrito Gt(ROSA)26Sor, un brazo de homología 5' con homología a 2,4 kb del locus Gt(ROSA)26Sor de ratón, una secuencia aceptora de corte y empalme, un sitio loxP, un promotor EM7, una secuencia que codifica la neomicina fosfotransferasa seguida por una señal de poli(A) de PGK, un sitio loxP, una secuencia que codifica DTA seguida por un IRES, una secuencia que codifica eGFP seguida por una señal de poli(A) de β-globina y finalmente un brazo de homología 3' con homología 2,8 kb del locus Gt(ROSA)26Sor. Como se describe en los ejemplos, el ratón respondedor produjo ratones viables tras el cruce que eran homocigóticos para el gen de DTA, lo que establece de forma eficaz una cepa respondedora de ratón que tiene un gen tóxico condicionado en un locus que permite la expresión, con la expresión del gen tóxico condicionado tras la presencia de una proteína activadora (en esta ocasión una recombinasa) específica para eliminar una secuencia que evita la expresión del gen tóxico (neo^r-poli(A) floxeada) posicionado adyacente al gen tóxico o entre la secuencia codificante de la proteína tóxica y el promotor Gt(ROSA)26Sor.

Cruce de la cepa Cre regulada por el desarrollo con la cepa letal condicionada

La cepa activadora regulada por el desarrollo (es decir, el ratón Nanog-Cre Tg) se cruzó con el ratón respondedor (es decir, el ratón ROSA-floxeada-STOP-DTA). Los ratones se cruzaron como se describe en el ejemplo 3. Ningún cruce del ratón Nanog-Cre Tg y el ratón ROSA-floxeada-STOP-DTA produjo descendencia. Este resultado es coherente con el cruce que produce un embrión que tiene tanto Cre dirigida por Nanog (o Cre dirigida por un promotor regulado por el desarrollo similar al promotor Nanog) y la construcción de DTA con la secuencia floxeada que evita su expresión en ausencia de Cre, y la expresión de Cre cuando Nanog (o un gen regulado por el desarrollo de forma similar) se activa en el embrión produciría la escisión de la secuencia floxeada adyacente a la secuencia de DTA y la expresión consiguiente del gen de DTA. La expresión del gen de DTA produciría que la ICM del embrión fracasara en sobrevivir, y no se producirían nacimientos vivos en ausencia de una célula donante añadida al embrión.

Se proporcionan ejemplos específicos a continuación. En general y de forma global, se cruzaron aproximadamente 703 ratones (aproximadamente 141 de fondo C57BL/6 y aproximadamente 562 de fondo Swiss Webster), sin la aparición de un ratón nacido vivo que fuera heterocigótico doble para Nanog-Cre y ROSA-floxeada-STOP-DTA.

Introducción de células ES donantes en un embrión generado a partir de un cruce de la cepa Cre regulada por el desarrollo y la cepa letal condicionada

La cepa activadora regulada por el desarrollo (es decir, el ratón Nanog-Cre) se cruzó con el ratón respondedor que tiene el gen tóxico letal condicionado (es decir, el ratón ROSA-floxeada-STOP-DTA). Los ratones se cruzaron como se describe en los ejemplos y se recogieron los embriones de las hembras preñadas y se diseñaron embriones

hospedadores para recibir las células ES donantes, como se describe en los ejemplos.

Ejemplos

- 5 Los siguientes ejemplos se incluyen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción de la manera de generar y usar los métodos y composiciones descritos en este documento, y no pretenden limitar el alcance de lo que los autores de la presente invención consideran su invención. Se han hecho esfuerzos por asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados Celsius y la presión es atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplo 1: Construcción de una cepa de ratón Nanog-Cre

- 15 La construcción Nanog-Cre para la cepa Nanog-Cre (activadora) (denominada "Nanog-Cre Tg") se generó por recombinación homóloga bacteriana (BHR) usando el cromosoma artificial bacteriano (BAC) 359m22 (biblioteca Incyte Genomics 129/SvJ) como fuente del gen Nanog de ratón y como destinatario del gen Cre insertado. La secuencia codificante de proteína de la proteína recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Abremski y Hoess (1984) J. Biol. Chem. 259:1509-1514) se insertó en el gen Nanog de tal manera que el segundo codón AUG en fase del ARNm de Nanog se convirtiera en el primer codón de Cre. La región codificante del gen Nanog que abarca 6,3 kb se reemplazó por un casete de 3,4 kb que contenía el gen Cre y el gen neo^r en fase. El gen neo^r se colocó bajo el control de los promotores de la fosfoglicerato cinasa (PGK) I de ratón (Pham *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13090-13095) y de EM7 bacteriano (para la selección positiva de células eucariotas y procariontes, respectivamente) y estaba seguido por la señal de poli(A) del gen de PGK. Los sitios FRT flanqueantes permiten la eliminación del casete PGK-EM7-neo^r en presencia de la recombinasa Flp (Joyner, A. L. 1999 Gene Targeting; a Practical Approach. Oxford University Press Inc., Oxford, Nueva York).

- La línea transgénica Nanog-Cre (es decir, Nanog-Cre Tg) se generó por inserción aleatoria de la construcción Nanog-Cre en células ES híbridas (denominadas células VGF1; 129SvEvTac/C57BL6NTacF1; véase Valenzuela *et al.* (2003) Nature Biotech. 21:652-659, *infra*). Un clon (denominado 1297A-D5) que portaba una única copia del transgén Nanog-Cre se microinyectó en un embrión en estadio de 8 células de acuerdo con el método de Poueymirou *et al.* (2007) Nature Biotech. 25:91-99 (el método "VelociMouse®") para producir ratones transgénicos Nanog-Cre, que se criaron hasta homocigosidad determinada por PCR cuantitativa del gen Cre.

35 Ejemplo 2: Construcción de una cepa de ratón letal condicionada que tiene un gen tóxico de DTA

- Se generó una cepa de ratón letal condicionada (denominada " ROSA-floxeada-STOP-DTA") introduciendo la construcción mostrada en la figura 2 (que contiene el gen de DTA adyacente a un marcador neo^r y la señal de poli(A) flanqueada en ambos lados por sitios loxP) en una célula ES de ratón CJ7.

- En resumen, se insertó la secuencia codificante de DTA en dirección 3' de un casete floxeado que contenía una secuencia codificante de neo^r y cuatro señales de poliadenilación en tándem (Soriano, P. (1999) Nat. Genet. 21:70-71). La secuencia codificante de DTA está seguida por una secuencia IRES-eGFP y cuatro secuencias de poli(A) de β-globina. Se empleó un segmento de 2,4 kb en dirección 5' del sitio Nhe I en el intrón 1 del locus Gt(ROSA)26Sor, y un fragmento de 2,8 kb en dirección 3' del sitio Nhe I en el intrón 1 del locus Gt(ROSA)26Sor, como brazos para la recombinación homóloga dirigida en las células ES de CJ7.

- Aunque se emplearon brazos de homología correspondientes a locus Gt(ROSA)26Sor, la eficacia descrita en este documento no depende del empleo de ningún bazo de homología particular y no depende de la inserción en ningún locus particular; todo lo que se requiere es que el "floxeado-STOP-gen tóxico" se coloque en un locus donde pueda expresarse DTA (por ejemplo, por un promotor que ya está en el genoma o por un promotor activado junto con la construcción de DTA) tras la escisión del casete de STOP-floxeado adyacente a la secuencia codificante de DTA.

- La secuencia codificante de DTA no se expresa hasta la escisión de la poli(A) del gen neo^r por la recombinasa Cre. Después de ello, un aceptor de corte y empalme anterior a la secuencia codificante de DTA facilitará su expresión a partir del locus que permite la expresión. La célula ES del ratón CJ7 que alberga la modificación ROSA-floxeada-STOP-DTA en el locus Gt(ROSA)26Sor (figura 2) se inyectó en un blastocisto derivado del cruce de ratones C57BL/6. Los ratones heterocigóticos para ROSA-floxeada-STOP-DTA se criaron hasta homocigosidad.

60 Ejemplo 3: Cruce de la cepa Nango-Cre con la cepa letal condicionada

- Se cruzaron ratones Nanog-Cre homocigóticos con ratones ROSA-floxeada-STOP-DTA heterocigóticos, y se cruzaron ratones Nanog-Cre heterocigóticos con ratones ROSA-floxeada-STOP-DTA heterocigóticos, generando 141 descendientes vivos. De los 141 descendientes vivos, no se encontró ninguno que fuera doble heterocigótico (es decir, no se encontró ninguno que fuera heterocigótico tanto para Nango-Cre como para ROSA-floxeada-STOP-DTA).

Ejemplo 4: Ratones derivados de célula ES a partir de inyecciones en blastocistos

Se cruzaron ratones Nanog-Cre Tg homocigóticos con ratones ROSA-floxeada-STOP-DTA homocigóticos para generar embriones adecuados para introducir células ES donantes.

Las células ES que eran genéticamente diferentes de los embriones hospedadores se emplearon para determinar fácilmente el nivel de quimerismo en cualquier animal nacido de los cruces. Las células ES donantes derivaban de VGF1 y contenían un alelo condicionado del gen Il2rg (o el gen para IL-2Ry) (clon 1371A-G6), que permitió el genotipado de los ratones de acuerdo con las características mostradas en la tabla 1:

Tabla 1 Genotipos de células ES y embriones hospedadores		
GEN	EMBRIÓN	CÉLULA ES
Cre	+ (presente)	- (ausente)
DTA	+ (presente)	-- (ausente)
Il2rg	+ (alelo de tipo silvestre presente)	- (alelo de tipo silvestre ausente) *
*El gen Il2rg mutado está en el único cromosoma X de la célula ES masculina.		

Para generar embriones en estadio de 8 células (grupo de control positivo) y embriones en el estadio de blastocisto para la inyección de células ES donantes, se superovularon 33 hembras Nanog-Cre Tg homocigóticas y se cruzaron con machos ROSA-floxeada-STOP-DTA homocigóticos. Se recogieron ciento cuarenta embriones en estadio de 8 células de las 25 hembras con tapón de copulación.

Veinticinco de los 140 embriones en estadio de 8 células recogidos recibieron una inyección del clon de VGF1 1371A-G6 (célula ES donante) de acuerdo con el método VelociMouse®, como se describe. Los 115 embriones restantes se cultivaron durante una noche hasta el estadio de blastocisto en KSOM. Después de cultivo durante una noche, 33 blastocistos eran adecuados para su inyección. Los 82 restantes eran viables, pero únicamente habían comenzado a cavitarse. Treinta y nueve de estos embriones en mórula tardía/blastocisto temprano se transfirieron sin inyectar a madres pseudopregnadas para que sirvieran como controles negativos, y los 43 restantes se desecharon. Los 33 embriones en estadio de blastocisto recibieron inyección del clon de VGF1 1371A-G6 y se cultivaron en KSOM antes de la transferencia de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica ((Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a Ed., 1994).

Ejemplo 5: Resultados de genotipado para ratones derivados de células ES a partir de inyecciones en blastocistos

El análisis genético para los marcadores enumerados en la tabla 1 de biopsias de la cola obtenidas de los ratones la generación F0 no logró detectar marcadores específicos del embrión hospedador, es decir, el gen Cre y el alelo Il2rg de tipo silvestre, e indicó una única copia del gen neo^t, lo que demuestra que los ratones derivaban de las células ES donantes.

Los 25 embriones en estadio de 8 células a los que se inyectó el clon 1371A-G6 usando el método VelociMouse® produjeron tres ratones vivos. Como se esperaba, los 39 blastocistos no inyectados no produjeron descendientes vivos. En contraste, los 33 blastocistos a los que se inyectaron células ES donantes produjeron seis ratones nacidos vivos, lo que demuestra que las células ES donantes podían rescatar los efectos letales de la combinación de Nanog-Cre y ROSA-floxeada-STOP-DTA en los embriones hospedadores.

Ejemplo 6: Ratones derivados de células donantes por inyección de 2 o 4 células ES

Se generaron ratones completamente derivados de células ES donantes usando los embriones que portan tanto la construcción Nanog-Cre como la construcción ROSA-floxeada-STOP-DTA, en condiciones que reducen la probabilidad de producir ratones completamente derivados de células ES. La inyección de 2 o 4 células donantes en un embrión en estadio de 8 células tiene menor probabilidad de producir ratones completamente derivados de células ES que la inyección de más células, por ejemplo, 6-8 o más células. En resumen, se usó el método VelociMouse®, descrito anteriormente, para generar embriones hospedadores inyectando 2 o 4 u 8 células ES de ratón donantes en embriones (embriones en estadio de 8 células) que portan (1) la construcción ROSA-floxeada-STOP-DTA en solitario (control), la construcción Nanog-Cre en solitario (control) o (2) tanto la construcción Nanog-Cre como la construcción ROSA-floxeada-STOP-DTA (experimental) descritas anteriormente. Las células ES donantes eran como describe en el ejemplo 4, es decir, derivadas de VGF1 (129Sv/EvB6 F1) y contenían un alelo condicionado del gen Il2rg. El fondo de la cepa para los embriones hospedadores fue una cepa mixta de C57BL/6 y 129 (predominantemente C57BL/6).

En resumen, los machos que portaban la construcción ROSA-floxeada-STOP-DTA (homocigóticos o heterocigóticos para la construcción ROSA-floxeada-STOP-DTA) se cruzaron con hembras B6 de tipo silvestre (control) o con hembras que portaban la construcción Nanog-Cre (homocigóticas para la construcción Nanog-Cre). Los cruces (y el genotipado resultante) se hicieron en dos conjuntos que empezaron en diferentes fechas. Las microinyecciones y el

5 genotipado también se hicieron en diferentes conjuntos en diferentes fechas. En total, nacieron 36 crías y todas las crías vivas se genotiparon para la contribución de cada progenitor y de las células ES donantes. El genotipado se realizó usando ensayos TaqMan™ para la presencia o ausencia de marcadores para el macho (DTA y eGFP; ROSA se midió por pérdida del ensayo de alelo para el gen Gt(ROSA)26Sor), la hembra (CRE) y para la célula ES donante (Il2rg y eGFP) para identificar unívocamente los genotipos de las crías. Los resultados se muestran en la tabla 2 para los controles y en la tabla 3 para los experimentales; los conjuntos de microinyecciones se denominaron "1" y "2". Los criterios para determinar la contribución completa de células ES en crías fueron los mismos que los descritos en Poueymirou *et al.* (2008) Nature Biotech. 25(1):93-99 en la figura 2a. El límite de detección de Il2rg es de aproximadamente menos de un 0,1 % (contribución del hospedador detectable hasta por debajo de un 0,1 %; véase la figura 2a de Poueymirou *et al.*). el genotipado se realizó sobre los siguientes tejidos: cerebro, pulmón, hígado, bazo, corazón, piel, extremidad posterior, extremidad anterior, estómago, riñón, intestino, cola.

15 Como se muestra la figura 3 (tabla 2) y en la figura 4 (tabla 3), donde el genotipo de un embrión incluye tanto la construcción Nanog-Cre como la construcción ROSA-floxeada-STOP-DTA, únicamente se generaron crías completamente derivadas de células ES. Los datos indican que cuando se inyectan menos células ES (por ejemplo, 2 o 4 células ES) en un embrión que carece de la construcción Nanog-Cre y de la construcción ROSA-floxeada-STOP-DTA, se muestra quimerismo.

REIVINDICACIONES

1. Un embrión de ratón, que comprende una célula que tiene en su genoma:
 - 5 a) un gen de recombinasa específica de sitio unido de forma funcional a un promotor Nanog que expresa el gen de recombinasa específica de sitio en una célula de la masa celular interna (ICM) pero no del trofotodermo;
 - (b) un gen que codifica una toxina, unido de forma funcional a un promotor, en el que el gen de la toxina está presente en un locus que permite la expresión; y
 - 10 (c) una secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen que codifica la toxina, en el que la secuencia de ácido nucleico está localizada entre el promotor del gen que codifica la toxina y la secuencia codificante del gen que codifica la toxina y está flanqueada en ambos lados por sitios de reconocimiento de recombinasa de modo que en presencia de la recombinasa específica de sitio se elimina la secuencia de nucleótidos y el promotor para el gen que codifica la toxina dirige la transcripción del gen que codifica la toxina.

- 15 2. Un método para generar un ratón o embrión de ratón a partir de una célula donante de ratón y un embrión hospedador que comprende:
 - (a) introducir células donantes de ratón en un embrión hospedador de ratón, en el que las células donantes de ratón se seleccionan del grupo que consiste en células madre embrionarias (ES), células madre pluripotentes (PS) o células madre pluripotentes inducidas (iPS), y en el que el embrión hospedador es un embrión en estadio de premórula y comprende
 - 20 (i) un gen de recombinasa específica de sitio unido de forma funcional a un promotor Nanog que expresa el gen de recombinasa específica de sitio en una célula de la masa celular interna (ICM), pero no del trofotodermo; y
 - (ii) un gen que codifica una toxina, unido de forma funcional a un promotor, en el que el gen de la toxina está presente en un locus que permite la expresión; y
 - 25 (iii) una secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen que codifica la toxina, en el que la secuencia de ácido nucleico está localizada entre el promotor para el gen que codifica la toxina y la secuencia codificante del gen que codifica la toxina y está flanqueada en ambos lados por sitios de reconocimiento de recombinasa de modo que en presencia de la recombinasa específica de sitio se elimina la secuencia de nucleótidos y el promotor para el gen que codifica la toxina dirige la transcripción del gen que codifica la toxina;
 - 30
 - 35 (b) gestar el embrión de la etapa (a) en una hembra de ratón pseudopreñada.

3. El método de la reivindicación 2, en el que después de la gestación en la hembra de ratón pseudopreñada, nace una cría de ratón, en el que la cría de ratón deriva completamente de la célula donante.

- 40 4. El embrión de ratón de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el gen de recombinasa específica de sitio codifica una recombinasa Cre, el gen cuya expresión evita la proliferación de la célula ICM es un gen que codifica un fragmento de toxina diftérica A (DTA) y el embrión es un embrión en estadio de 8 células.

- 45 5. El embrión de ratón de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la fase del embrión es un estadio de 8 células.

6. El embrión de ratón de la reivindicación 1, en el que la fase del embrión se selecciona de premórula, mórula y blastocisto, opcionalmente en el que el blastocisto carece sustancialmente de un endodermo primitivo.

- 50 7. El embrión de ratón de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la toxina es DTA.

8. El embrión de ratón de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la recombinasa específica de sitio es una recombinasa Cre o una recombinasa Cre modificada.

- 55 9. Una pareja de cría de ratones modificados genéticamente que, cuando se cruzan, generan un embrión que comprende una primera construcción de ácido nucleico y una segunda construcción de ácido nucleico en su genoma, comprendiendo dicha pareja de cría un primer ratón que comprende una primera construcción de ácido nucleico en su genoma y un segundo ratón que comprende una segunda construcción de ácido nucleico en su genoma,
- 60 en la que la primera construcción de ácido nucleico comprende un gen de recombinasa específica de sitio unido de forma funcional a un promotor Nanog que expresa el gen de recombinasa específica de sitio en una célula de la masa celular interna (ICM), pero no del trofotodermo, y
- 65 en la que la segunda construcción de ácido nucleico comprende un gen que codifica una toxina y una secuencia de ácido nucleico que evita la expresión del gen que codifica la toxina, en la que el gen que codifica la toxina está unido de forma funcional a un promotor y está presente en un locus que permite la expresión, en la que la secuencia de ácido nucleico está localizada entre el promotor para el gen que codifica la toxina y la secuencia codificante del gen

que codifica la toxina y está flanqueada en ambos lados por sitios de reconocimiento de recombinasa de modo que en presencia de la recombinasa específica de sitio la secuencia de nucleótidos se elimina y el promotor del gen que codifica la toxina dirige la transcripción del gen que codifica la toxina.

- 5 10. Un ratón que comprende el embrión de la reivindicación 1.

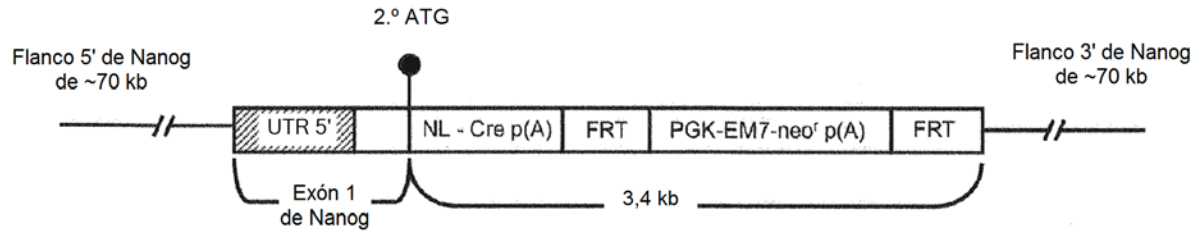


FIG. 1

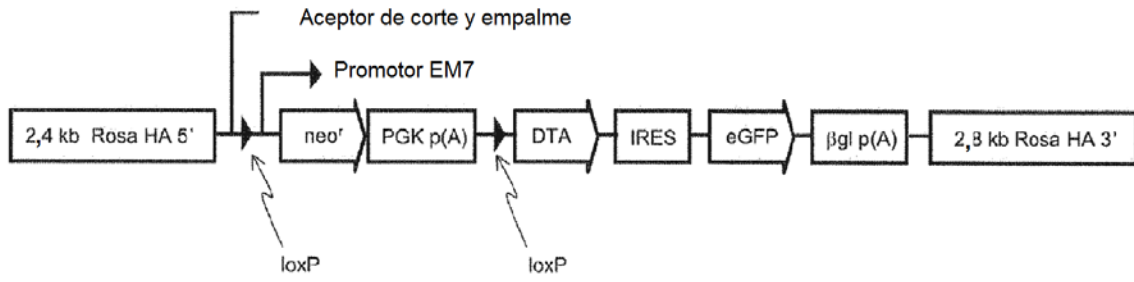


FIG. 2

Tabla 2: Resultado de inyecciones de 2 y 4 células ES en embriones en estadio de 8 células - controles									
Alelo del embrión	Microinyecciones de células ES		Marcadores genéticos detectados en ratones nacidos vivos						Contribución de células ES en los ratones
	Conjunto	n.º células ES	Ratón	Genotipo Rosa26	DTA	eGFP	Cre	Alelo Il2rg WT	
Rosa-DTA	1	4	C1	HET	Sí	Sí	No	Sí	ninguna, derivado de embrión hospedador
Nanog-Cre	1	2	C2	WT	No	No	Sí	Sí	ninguna, derivado de embrión hospedador
Nanog-Cre	1	2	C3	WT	No	No	Sí	Sí	ninguna, derivado de embrión hospedador
Nanog-Cre	1	2	C4	WT	No	No	Sí	Sí	ninguna, derivado de embrión hospedador
Nanog-Cre	1	4	C5	WT	No	Sí	Sí	Sí	baja, quimérico
Nanog-Cre	1	4	C6	WT	No	Sí	Sí	Sí	baja, quimérico
Rosa-DTA	2	4	C7	WT	Sí	Sí	No	Sí	alta, quimérico
Rosa-DTA	2	4	C8	WT	Sí	Sí	No	Sí	alta, quimérico
Rosa-DTA	2	4	C9	ND	Sí	Sí	No	Sí	media, quimérico
Rosa-DTA	2	4	C10	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA	2	4	C11	ND	Sí	Sí	No	Sí	baja, quimérico
Rosa-DTA	2	4	C12	ND	Sí	Sí	No	Sí	baja, quimérico
Rosa-DTA	2	2	C13	HET	Sí	Sí	No	Sí	ninguna, derivado de embrión hospedador
Rosa-DTA	2	2	C14	ND	Sí	Sí	No	Sí	media, quimérico
Rosa-DTA	2	2	C15	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA	2	2	C16	HET	Sí	Sí	No	Sí	ninguna, derivado de embrión hospedador
Rosa-DTA	2	2	C17	HET	Sí	Sí	No	Sí	ninguna, derivado de embrión hospedador
Rosa-DTA	2	2	C18	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA	2	2	C19	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA	2	2	C20	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA	2	2	C21	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES

FIG. 3

Tabla 3: Resultado de inyecciones de 2 y 4 células ES en embriones en estadio de 8 células - experimentales									
Alelo del embrión	Microinyecciones de células ES		Marcadores genéticos detectados en ratones nacidos vivos						Contribución de células ES en los ratones
	Conjunto	n.º células ES	Ratón	Genotipo Rosa26	DTA	eGFP	Cre	Alelo Il2rg WT	
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	2	E1	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	2	E2	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	2	E3	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	2	E4	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	2	E5	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	4	E6	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	4	E7	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	4	E8	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	4	E9	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	4	E10	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	4	E11	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES
Rosa-DTA, Nanog-Cre	1	4	E12	WT	No	Sí	No	No	completa, derivado de células ES

FIG. 4