

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 155**

51 Int. Cl.:

C12N 15/88	(2006.01)
C12N 15/89	(2006.01)
C12N 15/90	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)
C12N 15/873	(2010.01)
C12N 5/16	(2006.01)
A01K 67/02	(2006.01)
A01K 67/027	(2006.01)
C12N 15/87	(2006.01)
C12N 15/85	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2013 PCT/AU2013/000414**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13155572**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 13777737 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2839016**

54 Título: **Método de transfección de células**

30 Prioridad:

20.04.2012 US 201261636331 P
14.03.2013 US 201361783823 P
12.04.2013 AU 2013204327

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2019

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION (50.0%)**
Limestone Avenue
Campbell, ACT 2612, AU y
AVIAGEN (50.0%)

72 Inventor/es:

TYACK, SCOTT GEOFFREY

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 704 155 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de transfección de células

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para transfectar células. En particular, la presente invención se refiere a métodos para transfectar células germinales primordiales en aves.

Antecedentes

10 El desarrollo de una técnica eficiente para desarrollar aves transgénicas o modificadas genéticamente tiene una gran importancia para las industrias tanto agrícola como biofarmacéutica, así como para incrementar nuestra comprensión de la biología aviar a través de estudios genómicos funcionales. La producción de aves de corral jugará un papel importante para garantizar la seguridad alimentaria para el planeta a la vista del crecimiento de la población, y los avances modernos en biotecnología, tal como el desarrollo de aves de corral transgénicas ayudará a que la industria satisfaga la demanda de la población creciente.

15 Más específicamente, la aplicación de la tecnología transgénica para modificar rasgos en las aves de corral, algo que no es posible con la cría convencional, tal como resistencia a enfermedades y modulación de la determinación sexual, será ahora posible y proporcionará beneficios importantes para la industria de las aves de corral. La demanda de proteínas biofarmacéuticas está creciendo rápidamente y hasta hace poco se han usado sistemas de producción basados en células *in vitro* para producir nuevas proteínas recombinantes para el tratamiento de enfermedades. Ahora, se está desarrollando el uso de ganado transgénico como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes como una alternativa importante a los sistemas basados en células que son costosos y laboriosos. El desarrollo de la tecnología transgénica para los pollos ha permitido el desarrollo del huevo como un biorreactor para conseguir altos niveles de producción y purificación de proteínas biofarmacéuticas.

20 También se han hecho intentos para introducir genes extraños seleccionados clonándolos en un vector de retrovirus (p. ej., virus reticuloendotelial o virus de la leucosis aviar), inyectando el virus recombinante en huevos fértiles, permitiendo que el virus infecte el embrión en desarrollo (p. ej., células germinales primordiales), creando de esta manera una gónada u óvulo quimérico, y usando el recombinante resultante para intentar introducir un gen extraño en la progenie. Sin embargo, la industria de las aves de corral ha sido reticente a usar comercialmente esta tecnología ya que el virus (en su estado natural) es un patógeno, incluso los vectores de virus competentes para la replicación variantes pueden, a veces, inducir tumores, y las variantes incompetentes para la replicación requieren dosificaciones altas o repetidas. También, incluso las construcciones de virus defectivas para la replicación pueden presentar algún riesgo de recombinarse con la cubierta de virus endógenos y convertirse en competentes para la replicación. Además, estos vectores están limitados actualmente a insertos de ADN con un tamaño relativamente pequeño (p. ej., dos quilobases o menos).

25 También ha habido intentos para inyectar ADN extraño en el óvulo fertilizado no desarrollado después de su retirada quirúrgica de la gallina. Sin embargo, esta estrategia requirió la incubación del embrión en desarrollo en una serie de contenedores sustitutos. Además, requirió gallinerías ponedoras especializadas y una gran práctica para obtener las habilidades quirúrgicas y técnicas necesarias.

30 Una estrategia alternativa implica la inyección de células embrionarias o células germinales primordiales (CGP) modificadas genéticamente en un embrión receptor poco después de la puesta. En esta estrategia, se crearon cultivos de CGP que retenían su capacidad de diferenciarse en óvulos funcionales o células productoras de espermatozoides cuando se incorporaban en el embrión en desarrollo. Los cultivos de CGP de este tipo pueden modificarse genéticamente y después inyectarse en los embriones receptores. Los embriones receptores se habrán modificado típicamente por irradiación gamma para debilitar a las células germinales primordiales endógenas, de manera que se proporciona una ventaja de selección a las células inyectadas en su direccionamiento a la cresta gonadal. Las células modificadas madurarán entonces y producirán espermatozoides u óvulos capaces de transmitir el transgén al menos a la siguiente generación. Esta técnica es larga, sin embargo, ya que requiere la retirada de las CGP de un embrión donante, y su cultivo y reintroducción posterior en un embrión receptor. Además, la eficiencia con la que pueden obtenerse aves que comprenden CGP modificadas genéticamente usando esta técnica es baja.

35 De acuerdo con esto, permanece una necesidad de métodos para modificar genéticamente células germinales primordiales aviares.

Resumen de la invención

40 Los presentes inventores han encontrado que la inyección directa de reactivos de transfección mezclados con ADN en la sangre de embriones aviares en desarrollo tiene como resultado la introducción del ADN en las células germinales primordiales (CGP) y la inserción del ADN en el genoma del ave.

45 De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un método para producir un ave que comprende células germinales modificadas genéticamente, método que comprende:

55

(i) inyectar una mezcla de transfección que comprende un polinucleótido mezclado con un reactivo de transfección en un vaso sanguíneo de un embrión aviar,

en donde: (a) el polinucleótido comprende un transposón y la mezcla de transfección comprende una transposasa o un polinucleótido que codifica una transposasa; o

5 (b) la mezcla de transfección comprende una nucleasa dirigida, o un polinucleótido que codifica una nucleasa dirigida; y

mediante lo cual el polinucleótido se inserta en el genoma de una o más células germinales del ave; e

(ii) incubar el embrión a una temperatura suficiente para que el embrión se desarrolle en un polluelo.

10 La mezcla de transfección se inyecta preferiblemente en el embrión aviar en el momento de la migración de las CGP aproximadamente en los Estadios 12-17. En una realización preferida, la mezcla de transfección se inyecta en el embrión aviar en los Estadios 13-14.

Aunque puede usarse cualquier reactivo de transfección adecuado en los métodos de la invención, preferiblemente el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico.

15 En una realización, el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico monovalente seleccionado de uno o más de DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetil amonio), DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-3-(trimetilamonio)propano), DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi etil amonio) y DDAB (bromuro de dimetil dioctadecil amonio).

20 En otra realización, el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico polivalente seleccionado de uno o más de DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio) y DOSPER (1,3-dioleoiloxi-2-(6carboxi espermil)-propil-amida, TMTPS (tetrametiltetrapalmitoil espermina), TMTOS (tetrametiltetraoleil espermina), TMTLS (tetrametiltetralauril espermina), TMTMS (tetrametiltetramiristil espermina) y TMDOS (tetrametildioleil espermina).

En otra realización más, el reactivo de transfección comprende DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio).

25 En otra realización, el reactivo de transfección comprende además un lípido neutro. El lípido neutro puede comprender, por ejemplo, (DOPE) dioleoil fosfatidiletanolamina, DPhPE (difitanoilfosfatidiletanolamina) o colesterol.

En una realización particular, el reactivo de transfección comprende una mezcla 3:1 (p/p) de DOSPA y DOPE antes de mezclar el reactivo de transfección con el polinucleótido.

30 Ventajosamente, los métodos de la presente invención son adecuados para el uso de métodos no retrovirales para introducir un polinucleótido en el genoma de una célula germinal. Así, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un transposón o nucleasa de dedo de cinc.

En una realización particular, la mezcla de transfección comprende un polinucleótido que codifica una transposasa. La transposasa puede estar codificada por ADN tal como en un plásmido, o, alternativamente, el polinucleótido que codifica la transposasa es ARN.

35 En una realización específica, el transposón se selecciona de Tol2, mini-Tol2, Sleeping Beauty y PiggyBac.

En otra realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una nucleasa de dedo de cinc.

Aunque las células germinales que se modifican genéticamente en el ave pueden ser células germinales embrionarias, preferiblemente las células son células germinales primordiales.

40 En una realización, la mezcla de inyección se inyecta en el embrión en la cáscara de huevo en la que se desarrolla el embrión.

El polinucleótido en la mezcla de transfección puede ser una molécula de ARN o molécula de ADN que codifica un polipéptido, o una molécula de ADN que codifica un ARN que comprende una región bicatenaria. En una realización particular, el polinucleótido codifica una molécula de ARN que comprende una región bicatenaria. La molécula de ARN puede ser, por ejemplo, un ARNsi, ARNsh o ARN señuelo.

45 En otra realización, el polinucleótido codifica un polipéptido.

En una realización, la molécula de ARN o polipéptido reduce la replicación de un virus en una célula comparado con una célula que carece de la molécula de ARN o polipéptido.

Los métodos de la invención pueden usarse para tomar como diana cualquier patógeno viral de un ave. En una realización, el virus es el virus influenza.

También se describe un ave que comprende células germinales modificadas genéticamente, en donde el ave se produce por el método de la invención.

También se describe una célula germinal modificada genéticamente del ave de la invención, en donde la célula germinal comprende el polinucleótido insertado en el genoma.

- 5 También se describen espermias producidos por el ave que comprenden células modificadas genéticamente de la invención.

También se describe un huevo producido por el ave que comprende células modificadas genéticamente de la invención.

También se describe un método para modificar genéticamente células germinales en un ave, método que comprende

- 10 (i) inyectar una mezcla de transfección que comprende un polinucleótido mezclado con un reactivo de transfección en un vaso sanguíneo de un embrión aviar contenido en un huevo, e

(ii) incubar el embrión a una temperatura suficiente para permitir que el embrión se desarrolle en un polluelo, en donde el polinucleótido se inserta en el genoma de una o más células germinales en el ave.

- 15 En realizaciones adicionales, el método comprende una o más de las características de la invención como se describe en la presente memoria.

También se describe un método para producir un ave modificada genéticamente, método que comprende:

- (i) obtener el ave que comprende células germinales modificadas genéticamente de la invención,
(ii) criar a partir del ave que comprende células germinales modificadas genéticamente para producir progenie, y
(iii) seleccionar la progenie que comprende el polinucleótido insertado en el genoma.

- 20 También se describe un método para producir alimento, método que comprende:

- (i) obtener el ave que comprende células germinales modificadas genéticamente de la invención o el ave modificada genéticamente de la invención, y
(ii) producir alimento a partir del ave.

En un caso, el método comprende recoger carne y/o huevos del ave.

- 25 También se describe un método para criar un ave modificada genéticamente, método que comprende

- (i) llevar a cabo el método de la invención para producir un polluelo o progenie,
(ii) permitir que el polluelo o la progenie se desarrolle en un ave sexualmente madura, y
(iii) criar a partir del ave sexualmente madura para producir un ave modificado genéticamente.

También se describe un método para modular un rasgo en un ave, método que comprende

- 30 (i) inyectar una mezcla de transfección que comprende un polinucleótido mezclado con un reactivo de transfección en un vaso sanguíneo de un embrión aviar, mediante lo cual el polinucleótido se inserta en el genoma de una o más células germinales en el ave e

(ii) incubar el embrión a una temperatura suficiente para permitir que el embrión se desarrolle en un polluelo,

- 35 en donde el polinucleótido codifica un polipéptido o molécula de ARN que comprende una región bicatenaria que modula un rasgo en el ave.

En un caso, la molécula de ARN comprende un ARNsi, ARNsh o ARN señuelo.

En un caso, el rasgo se selecciona de masa muscular, sexo, contenido nutricional y/o resistencia a enfermedad.

- 40 También se describe un método para incrementar la resistencia de un ave a un virus, método que comprende llevar a cabo el método de la invención, en donde el polinucleótido es un ARNsi, ARNsh o ARN señuelo que reduce la replicación del virus en una célula, o el polinucleótido codifica un péptido antiviral que reduce la replicación del virus en una célula.

En un caso particular, el virus es el virus influenza.

En algunas realizaciones de la invención, el ave se selecciona de un pollo, pato, pavo, ganso, gallo bantam o codorniz.

En otra realización de los métodos de la invención, la mezcla de transfección comprende además una nucleasa dirigida, o un polinucleótido que codifica una nucleasa dirigida, para facilitar la integración del polinucleótido en el genoma de la célula germinal. Por ejemplo, la nucleasa dirigida puede seleccionarse de una Nucleasa de Dedo de Cinc, TALEN y CRISPR.

5 Una realización de la presente memoria es un método para producir un ave que comprende células germinales modificadas genéticamente, método que comprende:

(i) inyectar una mezcla de transfección que comprende un polinucleótido mezclado con un reactivo de transfección en un vaso sanguíneo de un embrión aviar, mediante lo cual el polinucleótido se inserta en el genoma de una o más células germinales en el ave, e

10 (ii) incubar el embrión a una temperatura suficiente para que el embrión se desarrolle en un polluelo,

en donde el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico, el polinucleótido comprende además una secuencia que codifica un transposón, y la mezcla de transfección se inyecta en el vaso sanguíneo del embrión aviar en los Estadios 13-14.

15 En una realización, el reactivo de transfección comprende Lipofectamina 2000 o una mezcla 3:1 (p/p) de DOSPA y DOPE antes de mezclar el reactivo de transfección con el polinucleótido, el transposón es Tol2 o mini-Tol2, y la mezcla de transfección comprende un polinucleótido que codifica la transposasa Tol2.

Una realización de la presente memoria es un método para producir un ave que comprende células germinales modificadas genéticamente, método que comprende:

20 (i) inyectar una mezcla de transfección que comprende un polinucleótido mezclado con un reactivo de transfección en un vaso sanguíneo de un embrión aviar, mediante lo cual el polinucleótido se inserta en el genoma de una o más células germinales en el ave, e

(ii) incubar el embrión a una temperatura suficiente para que el embrión se desarrolle en un polluelo,

25 en donde el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico y un lípido neutro, el polinucleótido comprende además una secuencia que codifica una nucleasa de dedo de cinc, y la mezcla de transfección se inyecta en el vaso sanguíneo del embrión aviar en los Estadios 13-14.

En una realización, el reactivo de transfección comprende Lipofectamina 2000 o una mezcla 3:1 (p/p) de DOSPA y DOPE antes de mezclar el reactivo de transfección con el polinucleótido.

Como será evidente, los rasgos y características preferidos de un aspecto de la invención son aplicables a muchos otros aspectos de la invención.

30 A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

35 La invención se describe a continuación en la presente memoria mediante los siguientes Ejemplos no limitativos y con referencia a las figuras adjuntas.

Descripción breve de los dibujos

Figura 1. Inyección directa de ADN que codifica EGFP formando un complejo con Lipofectamina 2000 en embriones aviares. Imágenes fluorescentes (lado izquierdo) y de campo brillante concordantes (lado derecho) de gónadas tomadas de embriones en el Día 7.

40 **Figura 2.** Imágenes de inyección directa de ADN que codifica EGFP formando un complejo con Lipofectamina 2000 en embriones aviares en el Día 14. Imágenes fluorescentes (lado derecho) y de campo brillante concordantes (lado izquierdo) de gónadas tomadas de embriones en el Día 14. La última imagen fluorescente es un primer plano de la agrupación de la izquierda de células verdes en un embrión. Esta región se retiró por disección del resto de la gónada para la tinción con el homólogo de vasa en pollos (*cvh*). Una pequeña sección del resto de la gónada se usó como un control negativo.

45 **Figura 3.** Inyección directa de ADN que codifica EGFP formando un complejo con Lipofectamina 2000 en embriones aviares. Tinción de células para el marcador de CGP *cvh*. Tinción con DAPI que muestra material nuclear y tinción de todas las células. *cvh*, un marcador específico de CGP, ha teñido una subpoblación de células (células de color gris más claro). Las células transformadas que han recibido el transposón a través de inyección directa y se tiñeron de verde se indican con flechas.

50

Figura 4. Confirmación de la optimización *in vitro* por Inyección Directa en embriones aviares. Expresión de EGFP en las gónadas de embriones en el Día 14.

Figura 5. Inyección directa de ADN que codifica EGFP y una construcción con múltiples cargas útiles que comprende múltiples secuencias que codifican ARNsh formando un complejo con Lipofectamina 2000 en embriones de pollo para engorde. Imágenes fluorescentes de gónadas en el Día 12.

Figura 6. Inyección directa de ADN que codifica EGFP, una construcción con múltiples cargas útiles y construcción en horquilla extendida formando un complejo con Lipofectamina 2000 en embriones de pollo para engorde. Imágenes fluorescentes de gónadas de embriones en el Día 14 después de la Inyección Directa.

Figura 7. Inyección directa de la construcción Tol2-EGFP con cada uno de dos casetes de expresión de ARNsh múltiples (pMAT084 y pMAT085). Imágenes de 10 gónadas tomadas en el Día 14 que muestran la expresión de EGFP.

Figura 8. Electroforesis en gel de productos de PCR de cribado que indican la integración del ARNsh PB en los embriones sometidos a inyección directa. Se extrajo ADN de una muestra enriquecida en CGP de los embriones tratados con ZFN, así como de embriones control a los 5 días después de la inyección directa con ZFN y un plásmido de reparación (que contenía el ARNsh PB). Se realizó entonces una PCR de cribado para detectar la integración del ARNsh PB en el genoma. El carril 1 muestra los embriones a los que se inyectó PB, el carril 2 los embriones control, el carril 3 células tratadas con ZFN (control positivo) y el carril 4 es un control de agua.

Claves para el listado de secuencias

SEQ ID NO:1 - Secuencia de polinucleótido de la construcción Tol2 EGFP

SEQ ID NO:2 - Secuencia de aminoácidos de la transposasa Tol2

20 SEQ ID NO:3 - Cebador oligonucleotídico Cribado 7

SEQ ID NO:4 - Cebador oligonucleotídico Cribado 6

SEQ ID NO:5 - Cebador oligonucleotídico directo de miniTol2

SEQ ID NO:6 - Cebador oligonucleotídico inverso de miniTol2

SEQ ID NO:7 - Sonda de detección de miniTol2

25 SEQ ID NO:8 - Cebador directo de la región genómica control

SEQ ID NO:9 - Cebador inverso de la región genómica control

SEQ ID NO:10 - Sonda de la región genómica control

Descripción detallada

Técnicas y definiciones generales

30 A no ser que se defina específicamente otra cosa, debe entenderse que todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica (p. ej., en química de proteínas, bioquímica, cultivo celular, genética molecular, microbiología, e inmunología).

A no ser que se indique otra cosa, las técnicas de ADN y proteínas recombinantes, cultivo celular, e inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándar, muy conocidos para los expertos en la técnica. Dichas técnicas se describen y explican en la bibliografía, en fuentes tales como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a edn, Cold Spring Harbour Laboratory Press (2001), R. Scopes, *Protein Purification - Principles and Practice*, 3^a edn, Springer (1994), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

45 El término "ave", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier especie, subespecie o raza de organismo de la Clase taxonómica *Aves*, tal como, pero no limitado a, organismos tales como pollo, pavo, pato, ganso, codorniz, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y rátidas incluyendo avestruz, emú y casuario. El término incluye las varias cepas conocidas de *Gallus gallus* (pollos), por ejemplo, Leghorn Blanco, Leghorn Marrón, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Cornualles, Menorca, Amrox, California Gris, perdiz italiana coloreada, así como cepas de pavos, faisanes, codornices, pato, avestruces y otras aves de corral criadas comúnmente en cantidades comerciales.

El término "aves de corral" incluye todas las aves mantenidas, recogidas, o domesticadas para carne o huevos, por ejemplo, pollo, pavo, avestruz, gallina silvestre, pichón, gallina de Guinea, faisán, codorniz, pato, ganso, y emú.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "ave modificada genéticamente" o "ave transgénica" se refiere a cualquier ave en la que una o más de las células del ave contienen ácido nucleico heterólogo introducido mediante la intervención humana.

Técnica de inyección directa

La línea germinal en pollos se inicia como células del epiblasto de un ingreso de embrión en Estadio X en el hipoblasto naciente (Kagami et al., 1997; y Petite, 2002). Al progresar el hipoblasto anteriormente, las pre-células germinales primordiales son llevadas al creciente germinal donde pueden identificarse como células grandes ricas en glucógeno. La identificación más temprana de células en la línea germinal por estos criterios morfológicos se produce aproximadamente 8 horas después del comienzo de la incubación (Estadio 4 usando el sistema de estadificación establecido por Hamburger y Hamilton, (1951)). Las células germinales primordiales residen en el creciente germinal desde el Estadio 4 hasta que migran a través de la vasculatura durante el Estadio 12-17. En ese momento, las células germinales primordiales son una pequeña población de aproximadamente 200 células. Desde la vasculatura, las células germinales primordiales migran a la cresta genital y se incorporan en el ovario o testículos al diferenciarse las gónadas.

Se han generado previamente pollos quiméricos en su línea germinal por el trasplante de CGP donantes y células germinales gonadales de varios estadios del desarrollo (blastodermo hasta embrión de 20 días) en embriones receptores. También se han descrito métodos para obtener pollos transgénicos a partir de cultivos a largo plazo de células germinales primordiales (CGP) aviares, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de EE.UU. 20060206952. Cuando se combinan con un embrión aviar huésped por procedimientos conocidos, estas CGP modificadas se transmiten a través de la línea germinal para rendir descendencia modificada genéticamente.

A diferencia de los métodos de la técnica anterior usados comúnmente que se basan en recoger las CGP de embriones donantes, los métodos de la presente invención implican la inyección directa de una mezcla de transfección en un embrión aviar. Así, los métodos de la invención pueden usarse para transfectar células germinales aviares incluyendo CGP y células germinales embrionarias.

Mezcla de transfección

En los métodos de la presente invención, un polinucleótido forma un complejo o se mezcla con un reactivo de transfección adecuado. El término "reactivo de transfección", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición añadida al polinucleótido para aumentar la captación del polinucleótido en una célula eucariota incluyendo, pero no limitado a, una célula aviar, tal como una célula germinal primordial. Aunque puede usarse cualquier reactivo de transfección que se sabe en la técnica que es adecuado para transfectar células eucariotas, los presentes inventores han encontrado que los reactivos de transfección que comprenden un lípido catiónico son particularmente útiles en los métodos de la presente invención. Así, en una realización preferida, se seleccionan lípidos catiónicos monovalentes de uno o más de DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetil amonio), DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano), DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi etil amonio) o DDAB (bromuro de dimetil dioctadecil amonio). Los lípidos catiónicos polivalentes preferidos son liposperminas, específicamente DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino) y DOSPER (1,3-dioleoiloxi-2-(6carboxiespermil)-propil-amida, y las di- y tetra-alkil-tetra-metil esperminas, incluyendo pero no limitado a, TMTPS (tetrametiltetrapalmitoil espermina), TMTOS (tetrametiltetraoleil espermina), TMTLS (tetrametiltetralauril espermina), TMTMS (tetrametiltetramiristil espermina) y TMDOS (tetrametildioleil espermina). Los lípidos catiónicos se combinan opcionalmente con lípidos no catiónicos, particularmente lípidos neutros, por ejemplo, lípidos tales como DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), DPhPE (difitanoilfosfatidiletanolamina) o colesterol. Una composición de lípido catiónico compuesta por una mezcla 3:1 (p/p) de DOSPA y DOPE o una mezcla 1:1 (p/p) de DOTMA y DOPE es generalmente útil en los métodos de la invención. Los ejemplos no limitativos de reactivos de transfección adecuados disponibles comercialmente que comprenden lípidos catiónicos incluyen Lipofectamina (Life Technologies) y Lipofectamina 2000 (Life Technologies).

En general, cualquier dendrímero que puede emplearse para introducir ácido nucleico en cualquier célula, particularmente en una célula eucariota, es útil en los métodos de esta invención. Se prefieren los dendrímeros de generación 5 o mayor (G5 o mayor), siendo particularmente interesantes los de la generación entre G5-G10. Los dendrímeros que pueden ser útiles en la invención incluyen aquellos con núcleos de NH₃ o etilendiamina, GX(NH₃) o GX(EDA), donde X=el número de generación. Se prefieren los dendrímeros en los que X=5-10. Los dendrímeros que pueden ser útiles en la invención incluyen aquellos en los que la unidad repetitiva de las capas internas es una amidoamina (para formar poliamidoaminas, es decir, PAMAM). Los dendrímeros útiles incluyen aquellos en los que los grupos funcionales terminales en la superficie externa del dendrímero proporcionan una densidad de carga positiva, p. ej., como con grupos funcionales amina terminales. La carga superficial y la naturaleza química de la superficie externa del dendrímero pueden variarse cambiando los grupos funcionales en la superficie, por ejemplo, por reacción de algunos o todos los grupos amina de la superficie. Son particularmente interesantes los dendrímeros que están funcionalizados por reacción con aminoácidos catiónicos, tales como lisina o arginina. Pueden emplearse

en los métodos de esta invención dendrímeros injertados como se describe, por ejemplo, en las solicitudes PCT WO 9622321 y WO9631549 y se indica en la Pat. U.S. No. 5,266,106. También pueden emplearse en los métodos de la invención dendrímeros activados (Haensler y Szoka, 1993; y Tang et al., 1996).

5 El reactivo de transfección puede comprender además secuencias peptídicas de proteínas virales, bacterianas o animales y otras fuentes, incluyendo péptidos, proteínas o fragmentos o partes de las mismas que puedan aumentar la eficiencia de la transfección de células eucariotas mediada por agentes de transfección, incluyendo lípidos catiónicos y dendrímeros. Dichos péptidos se describen en US 20030069173 e incluyen, por ejemplo, péptidos o proteínas virales del virus influenza, adenovirus, virus del bosque de Semliki, VIH, hepatitis, virus del herpes simple, virus de la estomatitis vesicular o virus de simio 40 y más específicamente una secuencia peptídica RGD, una
10 secuencia peptídica NLS y/o una secuencia peptídica VSVG y péptidos o proteínas modificados de cada uno de los anteriores.

El polinucleótido puede mezclarse (o "formar un complejo") con el reactivo de transfección según las instrucciones del fabricante o protocolos conocidos. Como ejemplo, cuando se transfecta ADN plasmídico con el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Life Technologies), el ADN puede diluirse en 50 µl de medio Opit-MEM y mezclarse suavemente. El reactivo Lipofectamina 2000 se mezcla suavemente y se diluye una cantidad apropiada en 50 µl de medio OptiMEM. Después de una incubación de 5 minutos, el ADN diluido y el reactivo de transfección se combinan y se mezclan suavemente a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Un volumen adecuado de la mezcla de transfección puede inyectarse directamente en un embrión aviar según el método de la invención. Típicamente, un volumen adecuado para la inyección en un embrión aviar es aproximadamente 1 µl a aproximadamente 3 µl, aunque los volúmenes adecuados pueden ser determinados por factores tales como el estadio del embrión y la especie de ave a la que se está inyectando. El experto en la técnica apreciará que los protocolos para mezclar el reactivo de transfección y el ADN, así como el volumen que se va a inyectar en el embrión aviar, pueden optimizarse a la vista de las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

Inyección en el embrión

25 Antes de la inyección, los huevos se incuban a una temperatura adecuada para el desarrollo embrionario, por ejemplo, alrededor de 37.5 a 38 °C, con el extremo puntiagudo (taglion) hacia arriba durante aproximadamente 2.5 días (Estadios 12-17), o hasta el momento en el que los vasos sanguíneos en el embrión tienen un tamaño suficiente como para permitir la inyección. El tiempo óptimo para la inyección de la mezcla de transfección es el momento de la migración de las CGP que típicamente ocurre alrededor de los Estadios 12-17, pero más preferiblemente en los
30 Estadios 13-14. Como apreciará el experto en la técnica, los pollos para engorde tienen típicamente embriones con un crecimiento más rápido, y de esta manera la inyección debería ocurrir preferiblemente más temprano en los Estadios 13-14 de manera que la mezcla de transfección se introduce en la corriente sanguínea en el momento de la migración de las CGP.

Para acceder a un vaso sanguíneo del embrión aviar, se hace un agujero en la cáscara del huevo. Por ejemplo, puede hacerse un agujero de aproximadamente 10 mm en el extremo puntiagudo del huevo usando un implemento adecuado tal como fórceps. La sección de la cáscara y las membranas asociadas se retiran cuidadosamente para evitar dañar el embrión y sus membranas.

Pueden usarse micropipetas compuestas por tubos capilares de vidrio siliconizado para inyectar la mezcla de transfección en el vaso sanguíneo del embrión aviar. Típicamente, las micropipetas se succionan o "tiran" con un tirador de micropipetas y las puntas se biselan con la ayuda de una esmeriladora de pipeta hasta un diámetro (apertura interna) de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 50 µm de diámetro, más preferiblemente alrededor de 25 µm a alrededor de 30 µm de diámetro. Las micropipetas se esmerilan típicamente hasta un diámetro de alrededor de 25 µm a alrededor de 30 µm para facilitar la inyección de las CGP en un embrión aviar. El experto en la técnica apreciará que puede usarse un diámetro más estrecho en los métodos de la presente invención ya que la mezcla de transfección no comprende células. Una micropipeta producida de esta manera también se refiere como un "capilar de vidrio estirado".

Un capilar de vidrio estirado se carga con aproximadamente 1-3 µl del complejo de transfección. La inyección se hace en cualquier vaso sanguíneo con un tamaño suficiente como para acomodar el capilar, tal como la vena marginal o la aorta dorsal, o cualquier otro vaso sanguíneo con un tamaño suficiente como para recibir el capilar. Puede usarse presión de aire para expeler el complejo de transfección desde el capilar al vaso sanguíneo.

Después de la inyección de la mezcla de transfección en el vaso sanguíneo del embrión aviar, el huevo se sella usando una cantidad suficiente de parafilm, u otra película sellante adecuada como se conoce en la técnica. Por ejemplo, cuando se ha hecho un agujero de 10 mm en la cáscara, puede usarse una pieza cuadrada de aproximadamente 20 mm de parafilm para cubrir el agujero. Puede usarse entonces una hoja de escalpelo templada para fijar el parafilm a la superficie externa del huevo. Los huevos se dan la vuelta entonces hacia la posición del extremo puntiagudo hacia abajo y se incuban a una temperatura suficiente para que el embrión se desarrolle, tal como hasta un análisis posterior o eclosión.

Tal y como se usa en la presente memoria, las expresiones "temperatura suficiente para que el embrión se desarrolle" y "temperatura suficiente para que el embrión se desarrolle en un polluelo" se refieren a las temperaturas de incubación que se requieren para que un embrión aviar continúe desarrollándose en el huevo y preferiblemente se desarrolle en un polluelo que está listo para eclosionar. Los expertos en la técnica pueden determinar las temperaturas de incubación adecuadas. Por ejemplo, un huevo de pollo se incuba típicamente a aproximadamente 35.8 a aproximadamente 38 °C. Están disponibles comercialmente incubadores que controlan la temperatura de incubación a niveles deseables, por ejemplo, 37.9 °C en los Días 1 a 6 después de la puesta, aproximadamente 37.6 °C en los Días 9 y 10, aproximadamente 37.5 °C en los Días 11 y 12, aproximadamente 37.4 °C en el Día 13, aproximadamente 37.3 °C en los Días 14 y 15, aproximadamente 37.2 °C en el Día 16, aproximadamente 37.1 °C en el Día 17, y que pueden caer hasta 35.8 °C sobre el Día 22.

Integración genómica de los polinucleótidos

Para facilitar la integración del polinucleótido en el genoma de las células germinales aviares, se usa preferiblemente un transposón, nucleasa de dedo de cinc, u otra construcción o vector no viral en el método de la invención.

Los ejemplos de transposones adecuados incluyen Tol2 (Kawakami et al., 2002), mini-Tol2, Sleeping Beauty (Ivics et al., 1997), PiggyBac (Ding et al., 2005), Mariner y Galluhop. El transposón Tol2 que se aisló por primera vez del pez medaka *Oryzias latipes* y que pertenece a la familia de transposones hAT se describe en Kawakami et al. (2000). Mini-Tol2 es una variante de Tol2 y se describe en Balciunas et al. (2006). Los transposones Tol2 y Mini-Tol2 facilitan la integración de un transgén en el genoma de un organismo cuando actúa conjuntamente con la transposasa Tol2. Mediante la administración de la transposasa Tol2 en un plásmido no replicativo separado, solo se integran en el genoma el transposón Tol2 o Mini-Tol2 y el transgén y el plásmido que contiene la transposasa Tol2 se pierde en un número limitado de divisiones celulares. Así, un transposón Tol2 o Mini-Tol2 integrado no tendrá ya la capacidad de experimentar un evento de transposición posterior. Adicionalmente, como se sabe que Tol2 no es un transposón aviar natural, no hay actividad transposasa endógena en una célula aviar, por ejemplo, una célula de pollo, que cause eventos de transposición adicionales. Como se entenderá en la técnica, puede incluirse un ARN que codifica la transposasa Tol2 en la mezcla de transfección como una alternativa a un plásmido de ADN que codifica la transposasa. Así, el transposón Tol2 y la transposasa son particularmente idóneos para uso en los métodos de la presente invención.

Puede usarse cualquier otro sistema de transposón adecuado en los métodos de la presente invención. Por ejemplo, el sistema de transposón puede ser un sistema de transposón Sleeping Beauty, Frog Prince o Mos1, o puede usarse cualquier transposón que pertenezca a la familia de transposones tc1/mariner o hAT.

El experto en la técnica entenderá que puede ser deseable incluir elementos genéticos adicionales en las construcciones que se van a inyectar en el embrión aviar. Los ejemplos de un elemento genético adicional que puede incluirse en la construcción de ácido nucleico incluyen un gen informador, tal como uno o más genes para una proteína marcadora fluorescente tal como GFP o RFP; una enzima que se pueda ensayar fácilmente tal como beta-galactosidasa, luciferasa, beta-glucuronidasa, cloranfenicol acetil transferasa o fosfatasa alcalina embrionaria secretada; o proteínas para las que están disponibles fácilmente inmunoensayos tales como hormonas o citoquinas. Otros elementos genéticos que pueden encontrar uso en realizaciones de la presente invención incluyen aquellos que codifican proteínas que confieren una ventaja selectiva en el crecimiento a las células tales como adenosina desaminasa, aminoglicósido fosfotransferasa, dihidrofolato reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, o resistencia a fármacos.

También pueden usarse tecnologías de edición genómica en los métodos de la invención. Como ejemplo, la tecnología de edición genómica puede ser una nucleasa dirigida. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "nucleasa dirigida" incluye la referencia a una proteína natural o a una proteína preparada por ingeniería. En una realización, la endonucleasa dirigida puede ser una meganucleasa. Las meganucleasas son endodesoxirribonucleasas caracterizadas por secuencias de reconocimiento largas, es decir, la secuencia de reconocimiento varía generalmente de aproximadamente 12 pares de bases a aproximadamente 40 pares de bases. Como consecuencia de este requerimiento, la secuencia de reconocimiento ocurre generalmente solo una vez en cualquier genoma dado. Entre las meganucleasas, la familia de endonucleasas con direccionamiento denominada LAGLIDADG se ha convertido en una herramienta valiosa para el estudio de genomas y modificación de genomas por ingeniería. Una meganucleasa puede estar dirigida a una secuencia cromosómica específica mediante la modificación de su secuencia de reconocimiento usando técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica.

En otra realización, la "nucleasa dirigida" es una nucleasa de dedo de cinc. Las nucleasas de dedo de cinc (ZFN) son nucleasas artificiales generadas fusionando un dominio de unión a ADN de dedo de cinc a un dominio de escisión de ADN. Los dominios de dedo de cinc pueden prepararse por ingeniería para dirigirse a secuencias de ADN diana deseadas y esto permite que las nucleasas de dedo de cinc tomen como diana secuencias únicas en genomas complejos. Aprovechando la maquinaria de reparación del ADN endógena, estos reactivos pueden usarse para alterar de forma precisa los genomas de organismos superiores. Las nucleasas de dedo de cinc son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente US No. 7,241,574 y se revisan en Durai et al. (2005) y Davis y Stokoe (2010).

Antes de la presente invención, se esperaba que con el fin de modificar las CGP usando la tecnología de nucleasas de dedo de cinc, las construcciones de dedo de cinc se introducirían en CGP cultivadas. Las células transfectadas que comprendieran la inserción/modificación deseada se seleccionarían y clonarían. Las células elegidas y clonadas se inyectarían en un embrión receptor deplecionado de CGP.

- 5 Los presentes inventores han encontrado, sorprendentemente, que la inyección directa de una construcción de nucleasa de dedo de cinc en un embrión aviar producía una modificación genómica específica que podía detectarse en la gónada del embrión transfectado en el Día 14. Este descubrimiento fue sorprendente porque se esperaba que los niveles combinados de eficiencia de la transfección y actividad de la nucleasa de dedo de cinc serían demasiado bajos para detectar una modificación específica en un embrión sometido a inyección directa. A la vista de la especificidad del direccionamiento de las secuencias de ADN deseadas, y el descubrimiento de los presentes inventores de que la combinación de una nucleasa de dedo de cinc y reactivo de transfección inyectado directamente en un embrión logra unos niveles de eficiencia mayores de los esperados, las nucleasas de dedo de cinc son particularmente útiles para introducir un polinucleótido en el genoma de una célula germinal aviar en los métodos de la presente invención.
- 10
- 15 En otra realización más, la endonucleasa dirigida puede ser una nucleasa efectora semejante a un activador de la transcripción (TALE) (véase, p. ej., Zhang et al., 2011). Los TALE son factores de transcripción del patógeno de plantas *Xanthomonas* que pueden prepararse fácilmente por ingeniería para unirse a nuevas dianas de ADN. Los TALE o versiones truncadas de los mismos pueden unirse al dominio catalítico de endonucleasas tales como FokI para crear endonucleasas dirigidas denominadas nucleasas TALE o TALEN.
- 20 En otra realización más, la "nucleasa dirigida" es una nucleasa de Repeticiones Palindrómicas Cortas Intercaladas Regularmente (CRISPR) (Barrangou, 2012). CRISPR es un sistema de nucleasa microbiano implicado en la defensa frente a fagos y plásmidos invasores. Los loci de CRISPR en huéspedes microbianos contienen una combinación de genes asociados a CRISPR (Cas), así como elementos de ARN no codificadores capaces de programar la especificidad de la escisión de ácido nucleico mediada por CRISPR. Se han identificado tres tipos (I-III) de sistemas CRISPR a lo largo de un amplio rango de huéspedes bacterianos. Una característica clave de cada locus de CRISPR es la presencia de una matriz de secuencias repetitivas (repeticiones directas) espaciadas entre sí por cadenas cortas de secuencias no repetitivas (espaciadores). La matriz de CRISPR no codificadora se transcribe y escinde en las repeticiones directas en ARNcr cortos que contienen secuencias espaciadoras individuales, que dirigen a las nucleasas Cas al sitio diana (protoespaciador).
- 25
- 30 El tipo II de CRISPR es uno de los sistemas mejor caracterizados (por ejemplo, véase Cong et al., 2013) y lleva a cabo la rotura dirigida de ADN bicatenario en cuatro etapas secuenciales. En primer lugar, dos ARN no codificadores la matriz de pre-ARNcr y ARNtracr, se transcriben del locus de CRISPR. En segundo lugar, el ARNtracr hibrida con las regiones de repetición del pre-ARNcr y media el procesamiento de pre-ARNcr en ARNcr maduros que contienen secuencias espaciadoras individuales. En tercer lugar, el complejo ARNcr:ARNtracr maduro dirige a Cas9 al ADN diana mediante emparejamiento de pares de bases de Watson-Crick entre el espaciador en el ARNcr y el protoespaciador en el ADN diana, al lado del resto adyacente al protoespaciador (PAM), un requerimiento adicional para el reconocimiento de la diana. Finalmente, Cas9 media la escisión del ADN diana para crear una rotura bicatenaria en el protoespaciador. El sistema CRISPR también puede usarse para generar roturas monocatenarias en el genoma. Así, el sistema CRISPR puede usarse para la edición genómica específica de sitio guiada por ARN.
- 35
- 40 Polinucleótidos

Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para incorporar polinucleótidos en el genoma de células germinales primordiales aviares que pueden transmitirse a la progenie modificada genéticamente. Los polinucleótidos integrados en el genoma pueden impartir una función o actividad deseable a las células modificadas genéticamente que comprenden el polinucleótido, tal como, por ejemplo, modificación de un rasgo de producción o incremento de la resistencia a enfermedad. Así, los polinucleótidos que pueden integrarse en el genoma de células germinales incluyen aquellos que codifican ARN de interferencia cortos (ARNsi), ARN de horquilla cortos (ARNsh), ARN de horquilla cortos extendidos (ARNeh), ARN catalíticos tales como ribozimas, ARN señuelos, así como aquellos que codifican polipéptidos endógenos o exógenos tales como aquellos que pueden usarse para modular un rasgo de producción o resistencia incrementada a enfermedad en un ave.

- 45
- 50 Así, en algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden usarse para modificar cualquier rasgo de una especie aviar. Los rasgos preferidos que pueden modificarse incluyen rasgos de producción y resistencia a enfermedad. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "rasgo de producción" se refiere a cualquier fenotipo de un ave que tiene valor comercial tal como masa muscular, sexo, resistencia a enfermedad o contenido nutricional. Los rasgos preferidos que pueden modificarse según los métodos de la presente invención incluyen sexo, masa muscular y resistencia a enfermedad. Los ejemplos de genes que pueden tomarse como diana para modificar el sexo como un rasgo de producción en un ave incluyen DMRT1, WPKCI (ASW), R-espondina, FOX9, aromatasa, AMH y β -catenina.
- 55

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "masa muscular" se refiere al peso del tejido muscular. Un incremento en la masa muscular puede determinarse pesando el tejido muscular total de un pájaro que nace de un

huevo tratado como se describe en la presente memoria cuando se compara con un pájaro de la misma especie de ave, más preferiblemente cepa o cruce de ave, e incluso más preferiblemente el mismo pájaro, al que no se ha administrado un ácido nucleico como se define en la presente memoria. Alternativamente, pueden usarse músculos específicos tales como músculos del pecho y/o pierna para identificar un incremento en la masa muscular. Los genes que pueden tomarse como diana para la modulación de la masa muscular incluyen, por ejemplo, el gen de la miostatina.

ARN de interferencia

En determinadas realizaciones, los métodos de la presente invención utilizan moléculas de ácido nucleico que codifican regiones bicatenarias para ARN de interferencia con el fin de modular rasgos en un ave. Los términos "ARN de interferencia", "ARNi" o "silenciador génico" se refieren generalmente a un proceso en el que una molécula de ARN bicatenario reduce la expresión de una secuencia de ácido nucleico con la que la molécula de ARN bicatenario comparte una homología sustancial o total. Sin embargo, se ha mostrado que el ARN de interferencia puede conseguirse usando moléculas bicatenarias que no son ARN (véase, por ejemplo, US 20070004667).

Las regiones bicatenarias deberían tener al menos 19 nucleótidos contiguos, por ejemplo, aproximadamente 19 a 23 nucleótidos, o pueden ser más largas, por ejemplo 30 o 50 nucleótidos, o 100 nucleótidos o más. Puede usarse la secuencia de longitud completa correspondiente al transcrito del gen entero. Preferiblemente, tienen una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos.

El grado de identidad de una región bicatenaria de una molécula de ácido nucleico con el transcrito diana debería ser al menos el 90 % y más preferiblemente el 95-100 %. La molécula de ácido nucleico puede, por supuesto, comprender secuencias no relacionadas que pueden funcionar para estabilizar la molécula.

El término "ARN de interferencia corto" o "ARNsi", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende ribonucleótidos capaces de inhibir o regular a la baja la expresión génica, por ejemplo, mediante ARNi de una manera específica de secuencia, en donde la parte bicatenaria tiene una longitud menor de 50 nucleótidos, preferiblemente una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos. Por ejemplo, el ARNsi puede ser una molécula de ácido nucleico que comprende regiones auto-complementarias con sentido y antisentido, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de esta, y la región con sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una parte de esta. El ARNsi puede ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena con sentido y la otra es la cadena antisentido, en donde las cadenas antisentido y con sentido son auto-complementarias.

Tal y como se usa en la presente memoria, se pretende que el término ARNsi sea equivalente a otros términos usados para describir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar ARNi específico de secuencia, por ejemplo, micro-ARN (ARNmi), ARN de horquilla corto (ARNsh), oligonucleótido de interferencia corto, ácido nucleico de interferencia corto (NA si), oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARNsi modificado químicamente, ARN silenciador génico post-transcripcional (ARNptgs), y otros. Además, tal y como se usa en la presente memoria, se pretende que el término ARNi sea equivalente a otros términos usados para describir ARN de interferencia específico de secuencia, tal como silenciamiento génico post-transcripcional, inhibición de la traducción, o epigenética. Por ejemplo, las moléculas de ARNsi como se describe en la presente memoria pueden usarse para silenciar epigenéticamente genes tanto a nivel post-transcripcional como al nivel pre-transcripcional. En un ejemplo no limitativo, la regulación epigenética de la expresión génica por moléculas de ARNsi como se describe en la presente memoria puede producirse a partir de la modificación mediada por ARNsi de la estructura de la cromatina para alterar la expresión génica.

Por "ARNsh" o "ARN de horquilla corto" se quiere decir una molécula de ARN en la que menos de aproximadamente 50 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos, están emparejados por bases con una secuencia complementaria localizada en la misma molécula de ARN, y en la que dicha secuencia y secuencia complementaria están separadas por una región no emparejada de al menos aproximadamente 4 a aproximadamente 15 nucleótidos que forma un bucle monocatenario por encima de la estructura de tallo creada por las dos regiones con complementariedad de bases.

Los ARNsh incluidos son ARNs de horquilla duales o con dos dedos o múltiples dedos, en los que la molécula de ARN comprende dos o más de dichas estructuras de tallo-bucle separadas por regiones espaciadoras monocatenarias.

La regulación por microARN es una rama especializada de la ruta de silenciamiento de ARN que evolucionó hacia la regulación génica, divergiendo de ARNi/PTGS convencional. Los microARN son una clase específica de ARN pequeños que están codificados en elementos semejantes a genes organizados en una repetición invertida característica. Cuando se transcriben, los genes de microARN dan lugar a ARN precursores con tallo-bucle a partir de los que se procesan posteriormente los microARN. Los microARN tienen típicamente una longitud de aproximadamente 21 nucleótidos. Los miARN liberados se incorporan en complejos semejantes a RISC que contienen un subconjunto particular de proteínas Argonauta que ejercen la represión génica específica de secuencia.

Resistencia a enfermedad

Los métodos de la presente invención pueden usarse para integrar un polinucleótido que confiere resistencia a enfermedad a una célula en el genoma de células germinales primordiales en un embrión aviar. Por ejemplo, el polinucleótido puede codificar una molécula de ácido nucleico tal como un ARN_{si}, ARN_{sh} o ARN_{mi} que reduce la expresión de un gen del huésped o patógeno produciendo una disminución de la replicación viral en células en las que está presente el polinucleótido. La "replicación de virus", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la amplificación del genoma viral en una célula huésped, el empaquetamiento del genoma viral en una célula y/o la liberación de partículas virales infecciosas de una célula.

Alternativamente, el polinucleótido puede codificar un ARN señuelo. Los ARN señuelos se conocen en la técnica y contienen secuencias de bases de nucleótidos particulares que se unen a proteínas de virus que son esenciales para la replicación de un virus patógeno. Los ARN señuelos que están dirigidos a proteínas de VIH fueron descritos en primer lugar por Sullenger et al. (1990). El experto en la técnica apreciará, sin embargo, que los ARN señuelos pueden diseñarse para tomar como diana proteínas que juegan un papel en la replicación de los patógenos virales aviares, tales como ARN señuelos dirigidos a las proteínas del complejo de la polimerasa del virus influenza.

Preferiblemente, mediante la reducción de la replicación de virus en células aviares, el ave modificado genéticamente que comprende el polinucleótido tendrá una resistencia incrementada a un patógeno viral. Tal y como se usa en la presente memoria, un ave que es "resistente" o tiene una "resistencia incrementada" a un patógeno o patógeno viral presenta síntomas reducidos o ausencia de síntomas de la enfermedad comparado con un ave susceptible cuando se expone al patógeno. Usando los métodos de la invención, las aves pueden hacerse resistentes a patógenos tales como, pero no limitado a, virus influenza, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad de Newcastle y virus de la enfermedad de la bolsa infecciosa.

Producción *in ovo* de proteínas recombinantes

Petitte y Modziak (2007) describen la gallina doméstica como un "biorreactor de proteínas muy eficiente". El reconocimiento de que el huevo de aves contiene grandes cantidades de proteína, y más de la mitad de la proteína de la clara o albúmina del huevo está compuesta por una única especie, hay un gran potencial para producir proteínas recombinantes o heterólogas en los huevos. Las dificultades encontradas en los métodos de la técnica anterior para producir aves de corral transgénicas para la producción de proteínas terapéuticas en huevos están bien descritas en la técnica. Aunque se ha conseguido usando un sistema de lentivirus indeseable, no se ha conseguido la producción de pájaros transgénicos que depositen altos niveles de proteínas comercialmente relevantes en un huevo. De acuerdo con esto, los métodos de la presente invención pueden usarse para producir aves modificadas genéticamente que expresan un polipéptido heterólogo o recombinante en huevos. Las proteínas con importancia comercial que podrían producirse en huevos incluyen proteínas terapéuticas tales como anticuerpos y antígenos para vacunas.

Producción y cría de aves modificadas genéticamente

También se describen métodos para criar aves modificadas genéticamente y métodos para producir alimento a partir de aves modificadas genéticamente. El experto en la técnica apreciará que un ave que comprende células germinales modificadas genéticamente puede ser quimérica en la línea germinal, ya que solo algunas de las células germinales que han migrado a las gónadas están modificadas genéticamente. Así, el ave que comprende células germinales modificadas genéticamente puede criarse para producir progenie en la que todas las células están modificadas genéticamente. Así, también se describe un método para producir un ave modificada genéticamente, método que comprende: (i) obtener el ave que comprende células germinales modificadas genéticamente (ii) criar a partir del ave que comprende células germinales modificadas genéticamente para producir progenie, y (iii) seleccionar la progenie que comprende el polinucleótido insertado en el genoma.

El ave que comprende células germinales modificadas genéticamente puede usarse en la producción de alimento. Así, los métodos descritos en la presente memoria son aplicables a la producción de productos de aves de corral para consumo humano y animal. Los métodos para producir alimento a partir de aves de corral son muy conocidos en la técnica y pueden comprender la recogida de carne y/o huevos de las aves de corral tales como, pero no limitado a, un pollo. En determinadas realizaciones, el ave se ha modificado genéticamente para incluir un polinucleótido que modula un rasgo de producción.

Ejemplos

50 Ejemplo 1. Inyección directa de la construcción de expresión de EGFP en embriones

Se formó un complejo con 5.1 µg de una construcción de ácido nucleico que codifica GFP mejorada (EGFP) flanqueado por secuencias Tol2 y 1.0 µg de un plásmido que codifica la transposasa Tol2 con 3 µl de Lipofectamina 2000. La formación de complejos de los ácidos nucleicos y el reactivo de transfección se llevó a cabo en un volumen total de 90 µl de medio OptiMEM u OptiPRO usando los tiempos de incubación recomendados por el fabricante (Life Technologies).

Después de la incubación final de 20 minutos, se inyectaron 1-3 μ l del complejo en un vaso sanguíneo de embriones de pollo en el Día 2.5 (Estadios 13-17; Hamburger y Hamilton, 1951). No se requirió retirada de sangre. El acceso al embrión se consiguió por la retirada de una pequeña sección (10 mm) de la cáscara. Después de la inyección, el agujero se selló con un cuadrado de 20 mm de parafilm.

- 5 La expresión de EGFP se observó en el Día 7 y Día 14 en la mayor parte de las gónadas a varios niveles. También se mostró que las células disociadas de las gónadas y las células verdes eran CGP (Figuras 1, 2 y 3).

Ejemplo 2. Optimización *in vitro* de las relaciones ADN a reactivo de transfección

- 10 Se realizaron experimentos para ensayar la relación óptima de ADN:Lipofectamina 2000 y el volumen del medio para preparar el complejo de transfección. Una construcción de ADN que codifica EGFP y una única horquilla (ARNsh) con secuencias Tol2 flanqueantes formó un complejo con Lipofectamina 2000 en volúmenes de OptiMEM de 50, 40, 30 o 20 μ l. Las relaciones de ADN (μ g) a Lipofectamina 2000 (μ l) usadas fueron como sigue: 1:2, 2:4 y 4:8.

Los complejos se transfectaron en células de fibroblastos de pollo (DF-1) y se analizaron para determinar la expresión de EGFP. Los resultados indicaron (no mostrados) que una relación de ADN (μ g):Lipofectamina 2000 de 1:2 en 30 μ l de medio funcionaba ligeramente mejor que una relación de 2:4 en 50 μ l.

- 15 Los datos *in vitro* se confirmaron posteriormente en embriones. Se formó complejos con 0.33 μ g de construcción de ADN que comprendía el transposón Tol2, 0.66 μ g de plásmido de transposasa, y 2 μ l de Lipofectamina 2000 en OptiMEM y se inyectó directamente en embriones de pollo. Todos los embriones vivos tenían buenos niveles de expresión de EGFP en el Día 14 (Figura 4).

Ejemplo 3. Ensayo del reactivo de transfección FuGene

- 20 Se ensayó FuGene (Promega) como un reactivo de transfección usando una relación ADN:Fugene similar a la recomendada por el fabricante para la transfección de cultivos celulares. La construcción de ADN formando un complejo con FuGene comprendía un casete de expresión de EGFP con secuencias Tol2 flanqueantes. El complejo (0.66 μ g de la construcción EGFP-Tol2, 1.33 μ g de plásmido de transposasa, 6 μ l de FuGene) se inyectó directamente en 15 embriones. Uno de los embriones mostró cantidades muy pequeñas de expresión de EGFP en las gónadas en el Día 14. Este experimento se repitió, y en el Día 12 los 10 embriones a los que se había inyectado todavía estaban vivos. Dos de los embriones tenían una pareja de células verdes en las gónadas.

Ejemplo 4. Transformación por inyección directa de líneas para engorde

- 30 Como los experimentos previos de inyección directa se habían realizado en líneas de pollos ponedores de huevos, el propósito de este experimento fue ensayar si el método de inyección directa podría usarse para transformar con éxito líneas de pollos para engorde. Se formó complejos con una construcción de expresión de EGFP que comprendía una única horquilla y secuencias Tol2 flanqueantes y Lipofectamina 2000 (0.33 μ g de construcción de transposón, 0.66 μ g de transposasa, 2 μ l de Lipofectamina 2000) y se inyectó directamente en la aorta dorsal de embriones de pollo. Doce de 13 embriones inyectados estaban vivos en el Día 10 y se detectaron buenas cantidades de expresión de EGFP en la mayor parte de las gónadas.

- 35 Este experimento se repitió con una construcción de expresión de EGFP que comprendía múltiples horquillas (ARNsh) (0.33 μ g de transposón, 0.66 μ g de transposasa, 2 μ l de Lipofectamina 2000). Se encontraron buenas cantidades de expresión de EGFP en los embriones en el Día 12 (Figura 5).

Ejemplo 5. Comparación de OptiMEM con OptiPRO como medio del reactivo de transfección

- 40 Se realizó una comparación entre OptiMEM (que contiene productos animales), OptiPRO (que no contiene productos animales), y PBSA como el medio del reactivo de transfección. Se formó complejos con una construcción de expresión de EGFP que comprendía secuencias Tol2 flanqueantes y el reactivo de transfección (0.33 μ g de transposón, 0.66 μ g de transposasa, 2 μ l de Lipofectamina 2000) y se inyectó directamente en embriones de pollo. Todos los embriones mostraron algo de verde en las gónadas en el Día 12 y el medio usado no afectó a la mortalidad. OptiMEM y OptiPRO proporcionaron resultados equivalentes, mientras PBSA produjo una expresión de EGFP significativamente reducida en las gónadas.

Ejemplo 6. Líneas de pollos ponedores inyectadas con una construcción con múltiples cargas útiles

- 50 Se formaron complejos con dos construcciones de ADN y reactivo de transfección y se inyectó directamente en embriones de pollo. La primera construcción de ADN comprendía un casete de expresión de EGFP y múltiples horquillas ARNsh flanqueados por secuencias Tol2, y la segunda construcción comprendía una construcción de expresión de EGFP y un casete de única horquilla extendida que codifica tres regiones bicatenarias. Se formaron complejos de las construcciones con reactivo de transfección en las siguientes cantidades: 0.33 μ g de transposón, 0.66 μ g de transposasa, 2 μ l de Lipofectamina 2000. En el Día 14, se encontró expresión de EGFP en las gónadas de la mayor parte de los embriones para ambas construcciones.

Ejemplo 7. Ensayo de la persistencia de Tol2-EGFP

Se formaron complejos de una construcción de ADN que comprendía un casete de expresión de EGFP, múltiples horquillas y flanqueado por Tol2 con reactivo de transfección. (0.33 µg de transposón, 2 µL de Lipofectamina 2000). El complejo de transfección sin transposasa se inyectó directamente en embriones de pollo.

- 5 Los embriones en los que se omitió la transposasa todavía mostraron células verdes en algunos embriones, pero en menos células que las observadas cuando se incluye la transposasa. Esto sugiere que el plásmido puede permanecer en las células gonadales durante al menos 2 semanas después de la inyección directa y que no todo el verde observado se debe a la integración de Tol2 en el genoma.

Ejemplo 8. Lipofectamina sin productos animales

- 10 Se formaron complejos con un casete de expresión de EGFP con Tol2 y múltiples casetes de expresión de ARNsh con un reactivo de transfección sin productos animales (Lipofectamina 2000CD) (0.33 µg de transposón, 0.66 µg de transposasa, 2 µl de Lipofectamina 2000 CD). En el Día 14, los 10 embriones examinados tenían buenas cantidades de expresión de EGFP en las gónadas (Figura 7).

Ejemplo 9. Inyección directa en el día 3.5

- 15 En todos los experimentos previos, las inyecciones de los complejos de transfección se realizaron en el Día 2.5. El propósito de este experimento fue ensayar un tiempo alternativo (Día 3.5) para la inyección directa de los embriones. Se formaron complejos con una construcción de ADN que comprendía una construcción de expresión de EGFP y Tol2 con Lipofectamina 2000CD (0.33 µg de transposón, 0.66 µg de transposasa, 2 µl de Lipofectamina2000 CD).

- 20 En el Día 14, 8 de los 21 embriones tenían pequeñas cantidades de expresión de EGFP en las gónadas. Así, el momento en el tiempo de la inyección directa en el Día 2.5 es importante, y sobre el Día 3.5, no se observa una transfección eficiente de las CGP.

Ejemplo 10. Alteración de las proporciones de transposón a transposasa

- 25 Mientras se mantenían las relaciones ADN:Lipofectamina2000 CD:medio, incrementamos la proporción de transposón en la mezcla de ADN mientras disminuíamos ligeramente la proporción de plásmido transposasa. Se usaron volúmenes ligeramente diferentes debido a la necesidad de inyectar más huevos en futuros experimentos. Los inventores también ensayaron retirar sangre del embrión antes de la inyección de la mezcla de transfección para determinar si esto permitía un volumen incrementado de la mezcla que se va a inyectar.

- 30 Se formaron complejos con una construcción de ADN que comprendía un casete de expresión de EGFP y Tol2 con reactivo de transfección. (0.66 µg de transposón, 1.0 µg de transposasa, 3 µl de Lipofectamina2000 CD). En el Día 14, los embriones con extracción de sangre previa tenían niveles similares de expresión de EGFP en las gónadas comparado con los embriones sin extracción de sangre. Las nuevas relaciones de ADN funcionaron bien, observándose buenos niveles de expresión de EGFP.

Ejemplo 11. Reactivo de transfección JetPEI

- 35 Para JetPEI, se formaron complejos con la construcción de ADN que comprendía un casete de expresión de EGFP y Tol2 con el reactivo de transfección (4 µg de transposón, 6 µg de transposasa, 1.6 µl de JetPEI (transfección Poliplus) en 50 µl de OptiPRO (con glucosa al 5 %). JetPEI produjo la coagulación de la sangre después de la inyección, pero esto no afectó la capacidad de supervivencia de los embriones. Se encontraron células verdes en estos embriones y en las gónadas, pero la mayoría eran morfológicamente diferentes de las CGP transformadas observadas cuando se usó Lipofectamina2000.

- 40 Se realizó un segundo experimento para ensayar el reactivo de transfección JetPEI. Se usaron dos mezclas de reacción: i) 0.66 µg de transposón, 1.0 µg de transposasa, 0.5 µl de JetPEI en 100 µl de OptiPRO (con glucosa al 5 %); y ii) 1.32 µg de transposón, 2.0 µg de transposasa, 0.5 µl de JetPEI en 100 µl de OptiPRO (con glucosa al 5 %).

- 45 JetPEI causó la coagulación de la sangre después de la inyección y la mezcla de reacción (ii) produjo una capacidad de supervivencia de los embriones mejorada. De nuevo, se encontró algo de expresión de EGFP en las gónadas, pero, de nuevo, no parecía que el tipo celular fuera semejante a CGP. Las gónadas se tomaron y las células se disociaron y tiñeron para detectar marcadores de CGP. Ninguna de las células verdes mostraron tinción para los marcadores de CGP, confirmando que las CGP no se habían transfectado por el complejo JetPEI.

Ejemplo 12. Nucleasa de dedo de cinc

- 50 El propósito del experimento fue determinar si los plásmidos de nucleasa de dedo de cinc pueden usarse para transformar CGP por la técnica de la inyección directa. El ADN usado en el experimento comprendía dos plásmidos de nucleasa de dedo de cinc y el fragmento solapado, que formó complejos con el reactivo de transfección 0.5 µg de cada plásmido, 3 µl de Lipofectamina2000 CD, en 90 µl de OptiPRO.

Como no había EGFP presente en los plásmidos, los inventores se basaron en un ensayo de PCR que amplificaría un fragmento, solo si el fragmento solapado se había incorporado en el genoma del pollo. Después de 14 días de incubación, las gónadas se retiraron, se enriquecieron en CGP usando un método de selección con anticuerpo, y se preparó ADN genómico. La PCR reveló que el fragmento solapado se había incorporado en el genoma del pollo. Estos resultados demuestran que las nucleasas de dedo de cinc son adecuadas para integrar ADN en el genoma de CGP aviares usando el método de inyección directa de la presente invención.

Ejemplo 13. Resultados

Siguiendo los protocolos indicados anteriormente, los inventores observaron una transformación significativa de CGP en las gónadas de embriones receptores, y en un grado mucho mayor que el descrito en los métodos de la técnica anterior para transfectar CGP. A través de la tinción de células con marcadores específicos de CGP, los inventores mostraron que la mayoría de las células transformadas en la gónada eran CGP. Los inventores han criado embriones receptores hasta la madurez sexual y han sido capaces de detectar secuencias de transposón Tol2 en el semen de >90 % de los machos adultos.

Se usaron otros reactivos de transfección, sin embargo, los reactivos basados en lípidos proporcionaron una transfección superior de CGP. JetPEI transfectó las células por este método, pero no se pudo mostrar que ninguna de las células transfectadas fuera CGP. FuGene transfectó las células a una tasa muy baja.

Ejemplo 14. Modificación del genoma por inyección directa usando nucleasas de dedo de cinc

Se inyectó una nucleasa de dedo de cinc (ZFN) dirigida a una región del intrón 5 el gen PANK1 junto con un plásmido que contenía el ARNsh PB1-2257 anti-influenza y las regiones requeridas para la reparación homóloga en embriones que se analizaron posteriormente para determinar la integración del ARNsh.

Un total de 1.5 µg de ADN (500 µg de cada plásmido ZFN y 500 µg del plásmido de reparación) se añadieron a 45 µl de OptiPRO y se formaron entonces complejos con 3 µl de lipofectamina2000 CD en 45 µl de OptiPRO antes de inyectarlo en 30 huevos de 2.5 días. Los huevos se incubaron hasta el día 7 cuando las gónadas se retiraron, se disociaron y se enriquecieron en CGP usando un separador MACS con un anticuerpo SSEA-1 (Santa Cruz Biotech). El ADN se extrajo de la muestra enriquecida en CGP de los embriones tratados con ZFN y embriones control usando un kit ADNeasy de Qiagen.

Se llevó a cabo una PCR para cribar la integración exitosa del ARNsh usando un cebador que se une al genoma fuera de la región usada para la reparación homóloga (Cribado 7 5' GTGACTCAGACTCCTGTTAG (SEQ ID NO:3)) y uno que se une al ARNsh (Cribado 6 5' TCTGCTGCTTCACAGTCTTC (SEQ ID NO:4)). La PCR se realizó usando mezcla maestra verde (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando las condiciones de ciclos de 94 °C durante 2 min seguido de 36 ciclos de 94 °C durante 45 segs, 55 °C durante 45 segs y 72 °C durante 1 min 10 seg. Esto fue seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 min.

La PCR se llevó a cabo en la muestra enriquecida en ADN de CGP de los embriones tratados con ZFN, así como de los embriones control, ADN de células control positivo, que se ha mostrado previamente que tienen el ARNsh integrado en ellas y un control de agua. La Figura 8 muestra la electroforesis en gel de estas reacciones de PCR. El primer carril, que contiene la PCR de los embriones a los que se inyectó directamente ZFN, muestra claramente una banda que indica la integración genómica en los embriones sometidos a inyección.

Ejemplo 15. Resultados de la modificación del genoma de pollos por inyección directa

Después de varias rondas de inyecciones directas, un total de 277 gallos se criaron hasta la madurez sexual y su semen se ensayó para determinar la presencia del transgén Tol2. De las 277 muestras ensayadas, se encontró que 98 contenían el transgén Tol2 con niveles variados de porcentaje de semen positivo. Varios de estos gallos positivos G(0) se aparearon y se crió un total de 7393 polluelos G(1). Se encontró que sesenta y cinco de los polluelos eran transgénicos. Los apareamientos posteriores usando estos polluelos G(1) han mostrado una herencia Mendeliana de los transgenes hasta la generación G(2).

Los polluelos nacidos se crecieron hasta la madurez sexual y se usó PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para detectar la presencia de miniTol-EGFP en el semen. Se recogieron muestras de semen y se extrajo el ADN de 20 µl de semen diluido en 180 µl de PBS usando el kit de sangre y tejido DNeasy de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico del semen se diluyó entonces 1/100 en ddH₂O para usarse en la reacción de PCR. Se llevó a cabo la qPCR en un Mastercycler® ep realplex (Eppendorf Hamburgo, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se pusieron a punto reacciones de 20 µl que contenían 10 µl de mezcla maestra universal Taqman 2x (Applied Biosystems), 1 µl de mezcla de ensayo marcada FAM 20x (Applied Biosystems) y 9 µl de ADN diluido. Cada muestra se dispuso en duplicado con cebadores y sonda específicos para minTol2:

Cebador directo 5' CAGTCAAAAAGTACTTATTTTTGGAGATCACT 3' (SEQ ID NO: 5)

Cebador inverso 5' GGGCATCAGCGCAATTCAATT 3' (SEQ ID NO:6);

Sonda de detección 5' ATAGCAAGGGAAAATAG 3' (SEQ ID NO:7);

y cebadores y sonda específicos para una región genómica control del genoma del pollo que actúa como un control de molde:

Cebador directo 5' GATGGGAAAACCCTGAACCTC 3' (SEQ ID NO:8);

Cebado inverso 5' CAACCTGCTAGAGAAGATGAGAAGAG 3' (SEQ ID NO:9);

5 Sonda de detección 5' CTGCACTGAATGGAC 3' (SEQ ID NO:10).

Los parámetros de los ciclos de PCR fueron una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Cada gallo se ensayó al menos dos veces y se clasificó como positivo si se obtuvo un valor de C_T de menos de 36 para minTol2. Un C_T de menos de 32 para la región genómica control se usó para indicar que había ADN suficiente en la muestra ensayada.

10 Los expertos en la técnica apreciarán que pueden hacerse numerosas variaciones y/o modificaciones a las realizaciones descritas anteriormente, sin apartarse del alcance amplio general de la presente descripción. Las presentes realizaciones deben considerarse, por lo tanto, en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

La presente solicitud reivindica prioridad de US 61/636,331 presentada el 20 de abril, de 2012, US 61/783,823 presentada el 14 de marzo de 2013 y AU 2013204327 presentada el 12 de abril de 2013.

15 Cualquier discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o semejantes que se ha incluido en la presente memoria descriptiva es solamente para el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una admisión de que cualquiera o todos estos contenidos forme parte de la base de la técnica anterior o eran conocimiento general común en el campo relevante a la presente invención como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

20 REFERENCIAS

Balciunas et al. (2006) PLoS Genet. 10:e169.

Barrangou (2012) Nature Biotechnology, 30:836-838.

Cong et al. (2013) Science, 339:819-823.

Davis y Stokoe (2010) BMC Med, 8:42.

25 Ding et al. (2005) Cell, 122:473-483.

Durai et al. (2005) Nucleic Acids Res, 33:5978-5990.

Hamburger y Hamilton (1951) J Morphol, 88:49-92.

Haensler y Szoka, (1993) Bioconjugate Chem, 4:372-379.

Ivics et al. (1997) Cell, 91:501-510.

30 Kagami et al. (1997) Mol Reprod Dev, 48:501-510.

Kawakami et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97:11403-11408.

Petitte (2002) J Poultry Sci, 39:205-228.

Petitte y Modziak (2007) Proc Natl Acad Sci USA, 104:1739-1740.

Sullenger et al. (1990) Cell, 63:601-608.

35 Tang et al. (1996) Bioconjugate Chem, 7:703-714.

Zhang et al. (2011) Nature Biotechnology, 29:149-153.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation MAT Malta Advanced Technologies Limited

<120> Método de transfección de células

40 <130> 513415

<150> US 61/636,331

<151> 20-04-2012

ES 2 704 155 T3

<150> US 61/783,823

<151> 14-03-2013

<150> AU 2013204327

<151> 12-04-2013

5 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4090

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de expresión de EGFP flanqueada por secuencias Tol2

<400> 1

cagaggtgta aagtacttga gtaatthttac ttgattactg tacttaagta ttatthtttg	60
ggatthtttac tttacttgag tacaatthaaa aatcaataact tttactthta cttatthaca	120
thttthtaga aaaaaagta cthtttactc cttacaatth tathttacagt caaaaagtac	180
ttatthtttg gagatcactt cattctatth tcccttgcta ttaccaaac aattgaattg	240
cgctgatgcc cagthtaatt taaatgtht ttatthctgcc tatgaaaatc gthttcacat	300
tatatgaaat tggcagaca tgttcattgg tcccttgga gtgacgtcat gtcacatcta	360
ttaccacaat gcacagcacc ttgacctgga aattagggaa attataacag tcaatcagt	420
gaagaaaatg gaggaagtat gtgattcatc agcagctgag agcagcacag tccaaaatca	480
gccacaggat caagagcacc cgtggccgta tcttcgcaga tgcacattga ttattgacta	540
gthattaata gthaatcaatt acggggthcat tagthcatag cccatathat gagthccgag	600
ttacataact tacggthaat gcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcctthga	660
cgtcaataat gacgtatgth cccatagthaa cgcctaatagg gactthccat tgacgtcaat	720
gggtggagta tttacggthaa actgcccact tggcagthaca tcaagtghat catatgccc	780
gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gccagthaca	840
tgaccthatg ggactthcct acttggcagth acatctacgt athagthcatc gctathacca	900
tgggtcgagg tgagccccac gthctgcttc actctcccc tctccccccc ctccccccc	960

ES 2 704 155 T3

ccaat1111gt atttatttat t1111taatta t1111gtgcag cgatgggggc gggggggggg 1020
 ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg 1080
 tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt ccttttatgg cgaggcggcg 1140
 gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc gcggcggcgg ggagtcgctg cgttgccctc 1200
 gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg ccgccccccc cgctctgac tgaccgcgtt 1260
 actcccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgttgg 1320
 ttaatgacgg ctcg1111ctt ttctgtggct gcgtgaaagc cttaaagggc tccgggaggg 1380
 ccct1111gtgc ggggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg 1440
 ccgcgtgcgg cccgcgctgc ccggcggcgtg tgagcgcctgc gggcgcggcg cggggc1111t 1500
 tgcgctccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg gccggggggc gtgccccgcg gtgcgggggg 1560
 gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt ggggggggtga gcaggggggtg 1620
 tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccccc ctgcaccccc ctccccgagt tgctgagcac 1680
 ggccccgctt cgggtgcggg gctccgtgcg gggcgtggcg cggggctcgc cgtgccgggc 1740
 ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc cgcctcgggc cggggagggc 1800
 tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcgc ccggcggcgtg tcgaggcgcg gcgagccgca 1860
 gccattgcct t1111atggtaa tcgtgcgaga gggcgcaggg acttcct1111t tcccaa1111t 1920
 ggcggagccg aaatctggga ggcgcgcccg cacc1111ctt agcggggcgcg ggcggaagcg 1980
 gtgcggcgcg ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg 2040
 tcccc1111tct cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcggggggg 2100
 acggggcagg gcgggg1111tgc gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa 2160
 ccattgtcat gcct1111tct t1111tctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct 2220
 gtctcatcat t1111ggcaaag aattgtacca ccattggtgag caagggcgcg gagctgttca 2280
 ccgggg1111tgg gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg 2340
 tgtccggcga gggcgcgggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcattctgca 2400
 ccaccggcaa gctgcccg1111t ccctggccca cactagtgac caccttcgct tacggcgtgc 2460
 agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc 2520
 ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc 2580
 gcgccgagg1111t gaagttcgcg ggcgacaccc tgg1111gaacc catcgagctg aagg1111catcg 2640
 acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaacttc aacagccaca 2700
 acgtatacat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc 2760
 acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg 2820
 gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag cacc1111gtcc gccctgagca 2880

ES 2 704 155 T3

aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgcccggga 2940
 tcactcacgg catggacgag ctgtacaagt agggcggctc gaggatatca ggatcaattc 3000
 actcctcagg tgcaggctgc ctatcagaag gtgggtggctg gtgtggccaa tgccctggct 3060
 cacaaatacc actgagatct tttccctct gccaaaaatt atggggacat catgaagccc 3120
 cttgagcatc tgacttctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat agtgtgttg 3180
 aattttttgt gtctctcact cggaaggaca tatgggaggg caaatcattt aaaacatcag 3240
 aatgagtatt tggtttagag tttggcaaca tatgcccata tgctggctgc catgaacaaa 3300
 ggttgctat aaagaggtca tcagtatatg aacagcccc ctgctgtcca ttccttattc 3360
 catagaaaag ccttgacttg aggttagatt tttttatat tttgttttgt gttatttttt 3420
 tctttaacat ccctaaaatt ttccttacct gttttactag ccagattttt cctcctctcc 3480
 tgactactcc cagtcatagc tgtccctctt ctcttatgga gatccctcga cctgcagccc 3540
 aagctcgagg gcccatctgg cctgtgtttc agacaccagg gagtctctgc tcacgtttcc 3600
 tgctatttgc agcctctcta tcaagactaa tacacctctt cccgcatcgg ctgcctgtga 3660
 gaggcttttc agcactgcag gattgctttt cagccccaaa agagctaggc ttgacactaa 3720
 caattttgag aatcagcttc tactgaagtt aaatctgagg ttttacaact ttgagtagcg 3780
 tgtactggca ttagattgtc tgtcttatag tttgataatt aaatacaaac agttctaaag 3840
 caggataaaa ccttgatgac atttcattta atgttttttg agattaaaag cttaacaag 3900
 aatctctagt tttctttctt gcttttactt ttacttctt aatactcaag tacaatttta 3960
 atggagtact tttttacttt tactcaagta agattctagc cagatacttt tacttttaat 4020
 tgagtaaaat tttccctaag tacttgtact ttcacttgag taaaattttt gagtactttt 4080
 tacacctctg 4090

<210> 2

<211> 706

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia que codifica la transposasa Tol2

<400> 2

Met Phe Met Pro Ser Ser Phe Ser Tyr Ser Ser Trp Ala Thr Cys Trp
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Cys Leu Ile Ile Leu Ala Lys Asn Ser Ser Arg Ser Ser
 20 25 30

His Ile Tyr Tyr His Asn Ala Gln His Leu Asp Leu Glu Ile Arg Glu

ES 2 704 155 T3

Phe Glu Val Leu Ala Ser Ala Met Asn Asp Ile His Ser Glu Tyr Glu
 290 295 300
 Ile Arg Asp Lys Val Val Cys Thr Thr Thr Asp Ser Gly Ser Asn Phe
 305 310 315 320
 Met Lys Ala Phe Arg Val Phe Gly Val Glu Asn Asn Asp Ile Glu Thr
 325 330 335
 Glu Ala Arg Arg Cys Glu Ser Asp Asp Thr Asp Ser Glu Gly Cys Gly
 340 345 350
 Glu Gly Ser Asp Gly Val Glu Phe Gln Asp Ala Ser Arg Val Leu Asp
 355 360 365
 Gln Asp Asp Gly Phe Glu Phe Gln Leu Pro Lys His Gln Lys Cys Ala
 370 375 380
 Cys His Leu Leu Asn Leu Val Ser Ser Val Asp Ala Gln Lys Ala Leu
 385 390 395 400
 Ser Asn Glu His Tyr Lys Lys Leu Tyr Arg Ser Val Phe Gly Lys Cys
 405 410 415
 Gln Ala Leu Trp Asn Lys Ser Ser Arg Ser Ala Leu Ala Ala Glu Ala
 420 425 430
 Val Glu Ser Glu Ser Arg Leu Gln Leu Leu Arg Pro Asn Gln Thr Arg
 435 440 445
 Trp Asn Ser Thr Phe Met Ala Val Asp Arg Ile Leu Gln Ile Cys Lys
 450 455 460
 Glu Ala Gly Glu Gly Ala Leu Arg Asn Ile Cys Thr Ser Leu Glu Val
 465 470 475 480
 Pro Met Phe Asn Pro Ala Glu Met Leu Phe Leu Thr Glu Trp Ala Asn
 485 490 495
 Thr Met Arg Pro Val Ala Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Ala Glu Thr
 500 505 510
 Asn Thr Gln Leu Gly Trp Leu Leu Pro Ser Val His Gln Leu Ser Leu
 515 520 525
 Lys Leu Gln Arg Leu His His Ser Leu Arg Tyr Cys Asp Pro Leu Val
 530 535 540

ES 2 704 155 T3

Asp Ala Leu Gln Gln Gly Ile Gln Thr Arg Phe Lys His Met Phe Glu
545 550 555 560

Asp Pro Glu Ile Ile Ala Ala Ala Ile Leu Leu Pro Lys Phe Arg Thr
565 570 575

Ser Trp Thr Asn Asp Glu Thr Ile Ile Lys Arg Gly Met Asp Tyr Ile
580 585 590

Arg Val His Leu Glu Pro Leu Asp His Lys Lys Glu Leu Ala Asn Ser
595 600 605

Ser Ser Asp Asp Glu Asp Phe Phe Ala Ser Leu Lys Pro Thr Thr His
610 615 620

Glu Ala Ser Lys Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Ala Cys Val Ser Asp Thr
625 630 635 640

Arg Glu Ser Leu Leu Thr Phe Pro Ala Ile Cys Ser Leu Ser Ile Lys
645 650 655

Thr Asn Thr Pro Leu Pro Ala Ser Ala Ala Cys Glu Arg Leu Phe Ser
660 665 670

Thr Ala Gly Leu Leu Phe Ser Pro Lys Arg Ala Arg Leu Asp Thr Asn
675 680 685

Asn Phe Glu Asn Gln Leu Leu Leu Lys Leu Asn Leu Arg Phe Tyr Asn
690 695 700

Phe Glu
705

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cribado 7 cebador oligonucleotídico

<400> 3

gtgactcaga ctctgttag 20

10 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cribado 6 cebador oligonucleotídico

<400> 4

tctgctgctt cacagtcttc 20
 <210> 5
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico directo para miniTol2
 <400> 5
 cagtcaaaaa gtactattt ttggagatc act 33
 10 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador oligonucleotídico inverso para miniTol2
 <400> 6
 gggcatcagc gcaattcaat t 21
 <210> 7
 <211> 17
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección para miniTol2
 <400> 7
 25 atagcaaggg aaaatag 17
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador directo para la secuencia de control genómico
 <400> 8
 gatgggaaaa ccctgaacct c 21
 <210> 9
 35 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 704 155 T3

<220>

<223> Cebador inverso para la secuencia de control genómico

<400> 9

caacctgcta gagaagatga gaagag 26

5 <210> 10

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Sonda oligonucleotídica para la región genómica control

<400> 10

ctgcactgaa tggac 15

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un ave que comprende células germinales modificadas genéticamente, método que comprende:
 - (i) inyectar una mezcla de transfección que comprende un polinucleótido mezclado con un reactivo de transfección en un vaso sanguíneo de un embrión aviar,
 - en donde
 - (a) el polinucleótido comprende un transposón y la mezcla de transfección comprende una transposasa o un polinucleótido que codifica una transposasa; o
 - (b) la mezcla de transfección comprende una nucleasa dirigida, o un polinucleótido que codifica una nucleasa dirigida; y
 - mediante lo cual el polinucleótido se inserta en el genoma de una o más células germinales primordiales en el ave, e
 - (ii) incubar el embrión a una temperatura suficiente para que el embrión se desarrolle en un polluelo.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de transfección se inyecta en el embrión aviar en los Estadios 13-14.
3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico.
4. El método de la reivindicación 3, en donde
 - i) el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico monovalente seleccionado de uno o más de DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetil amonio), DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-3-(trimetilamonio)propano), DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi etil amonio) y DDAB (bromuro de dimetil dioctadecil amonio), y/o
 - ii) el reactivo de transfección comprende un lípido catiónico polivalente seleccionado de uno o más de DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio) y DOSPER (1,3-dioleoiloxi-2-(6carboxi espermil)-propil-amida, TMTPS (tetrametiltetrapalmitoil espermina), TMTOS (tetrametiltetraoleil espermina), TMTLS (tetrametiltetralauril espermina), TMTMS (tetrametiltetramiristil espermina) y TMDOS (tetrametildioleil espermina).
5. El método de la reivindicación 3 o reivindicación 4, en donde el reactivo de transfección comprende además un lípido neutro.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la mezcla de transfección comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una transposasa o una nucleasa dirigida seleccionada del grupo que consiste en una nucleasa de dedo de cinc, una TALEN o una nucleasa dirigida CRISPR.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la mezcla de inyección se inyecta en el embrión en la cáscara del huevo en la que se desarrolla el embrión.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polinucleótido codifica una molécula de ARN que comprende una región bicatenaria, o el polinucleótido codifica un polipéptido.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde, cuando está presente en el genoma del ave, o una progenie de este, el polinucleótido modifica un rasgo del ave.
10. Un método para incrementar la resistencia de un ave a un virus, método que comprende llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el polinucleótido codifica un ARNsi, ARNsh o ARN señuelo que reduce la replicación del virus en una célula, o el polinucleótido codifica un péptido antiviral que reduce la replicación del virus en una célula.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el ave se selecciona de un pollo, pato, pavo, ganso, gallo bantam o codorniz.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el polinucleótido comprende un transposón y la mezcla de transfección comprende una transposasa o un polinucleótido que codifica una transposasa.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la mezcla de transfección comprende una nucleasa dirigida, o un polinucleótido que codifica una nucleasa dirigida.
14. El método de la reivindicación 13, en donde la nucleasa dirigida codificada es una nucleasa dirigida CRISPR.

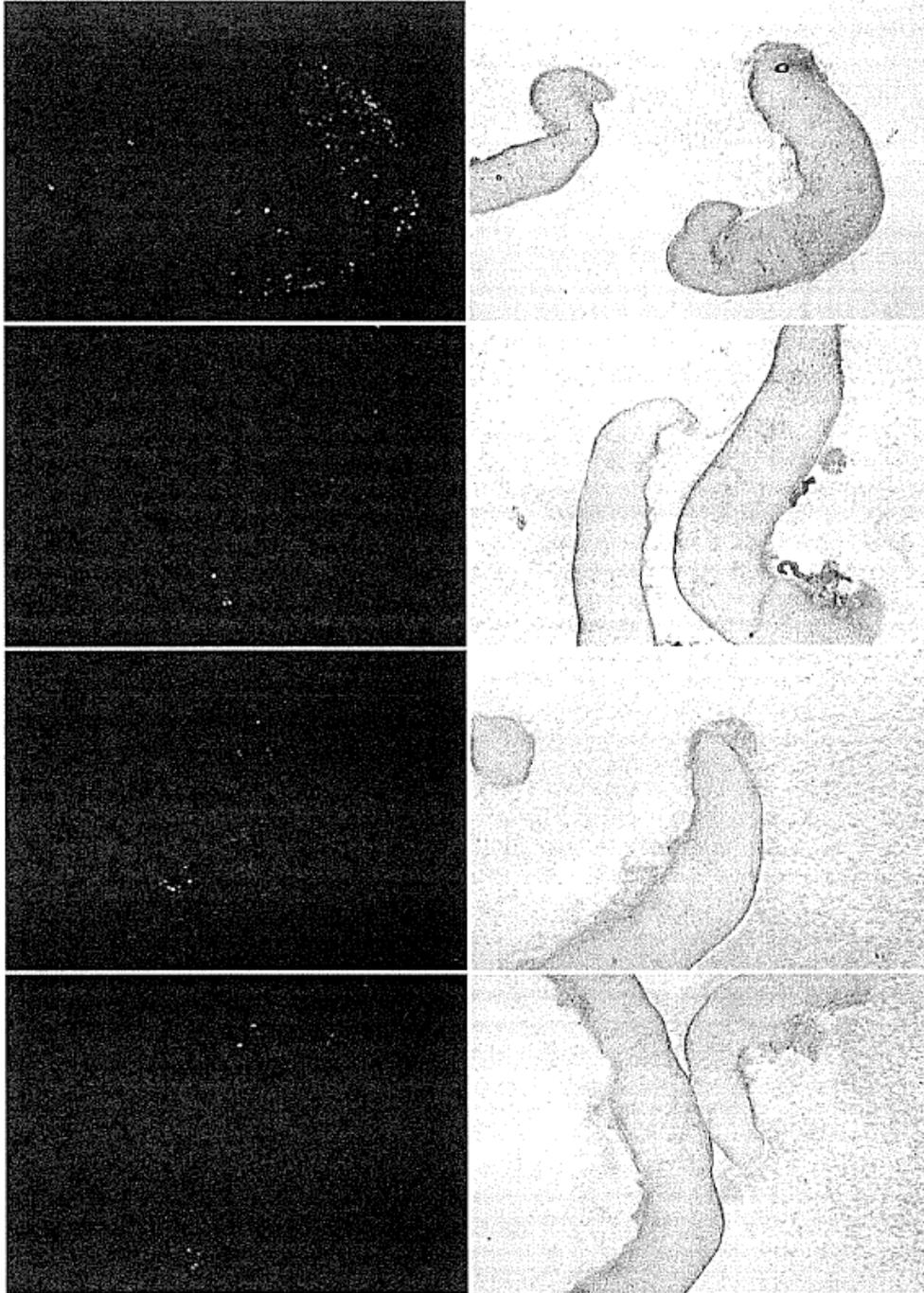


Figura 1

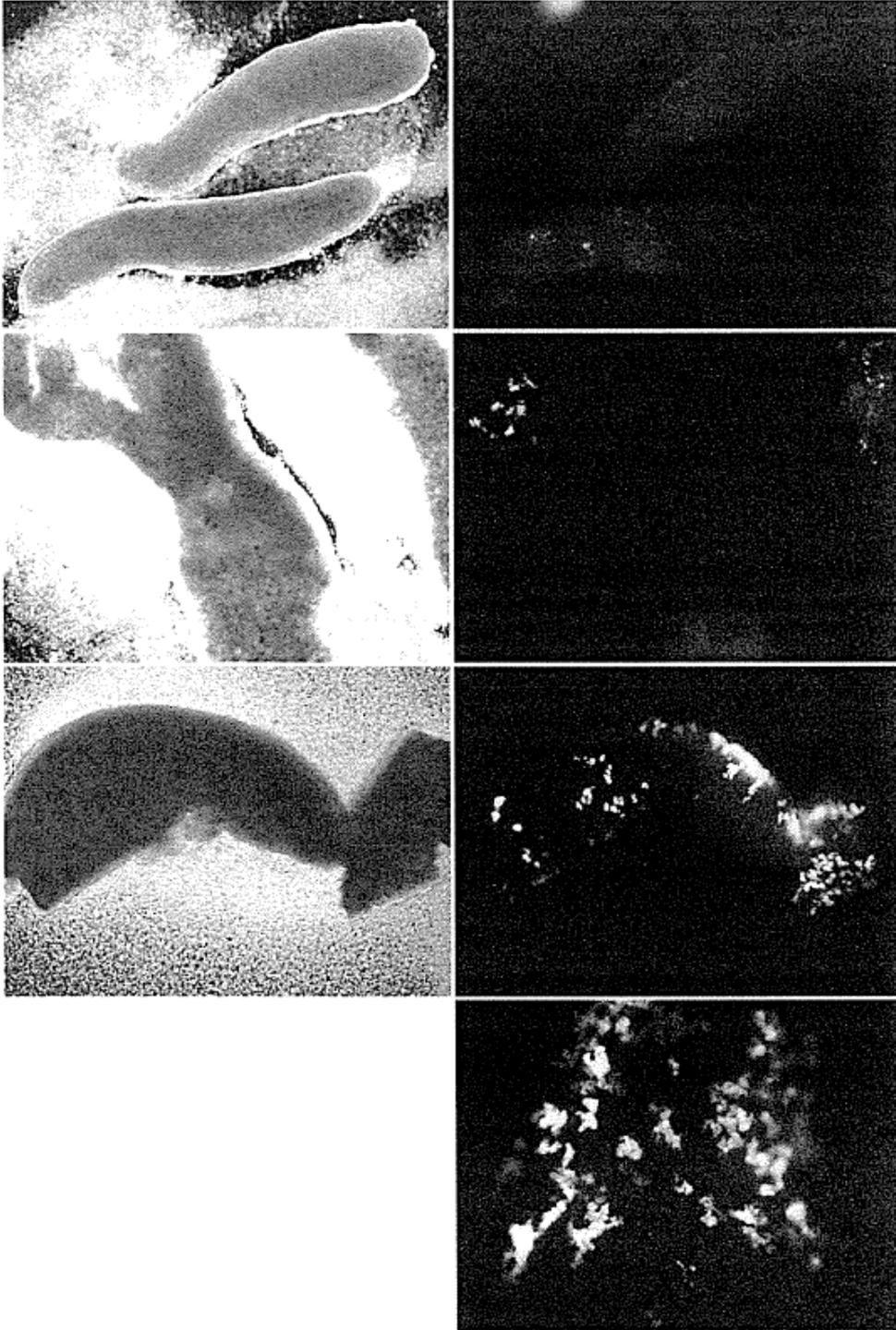


Figura 2

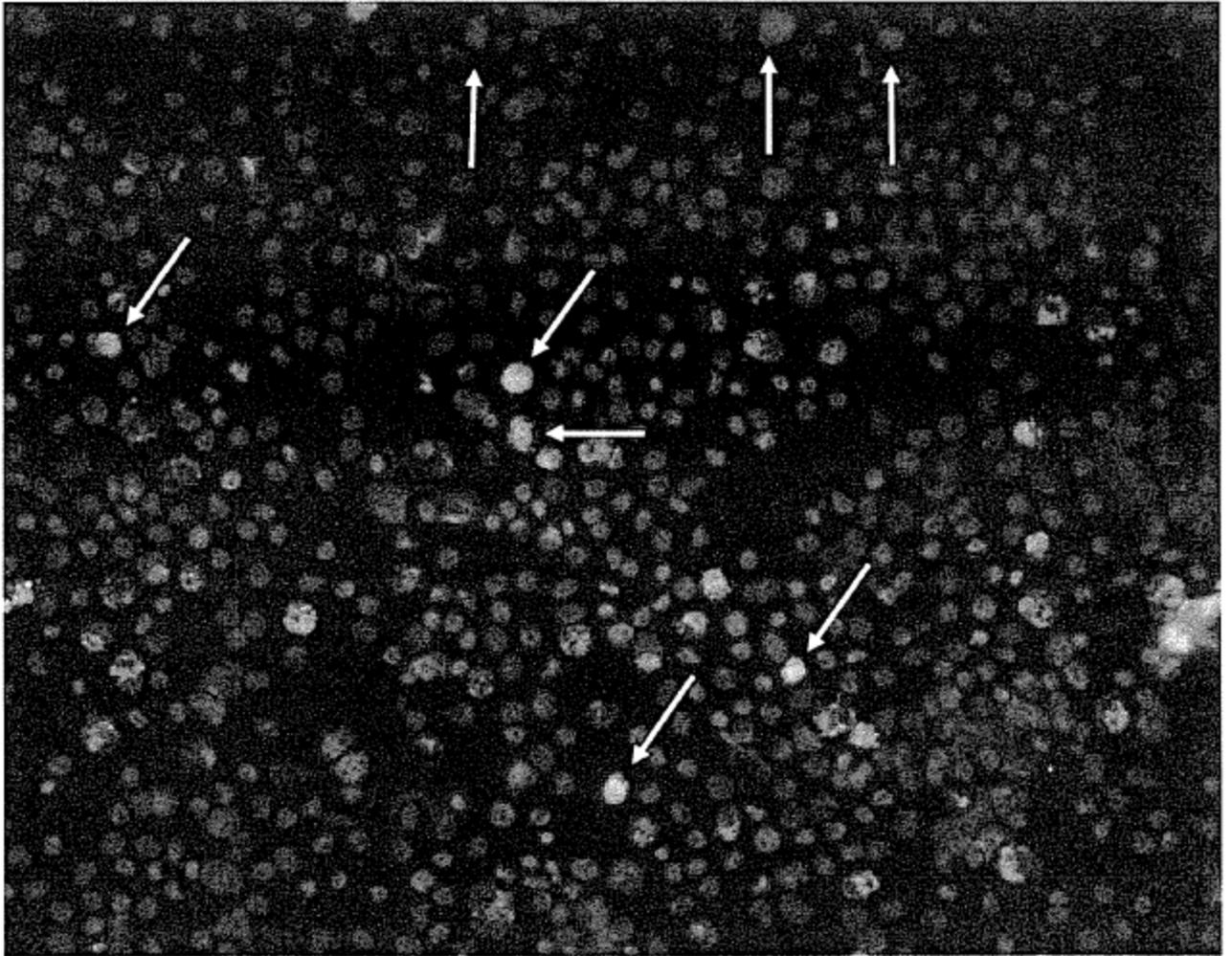


Figura 3

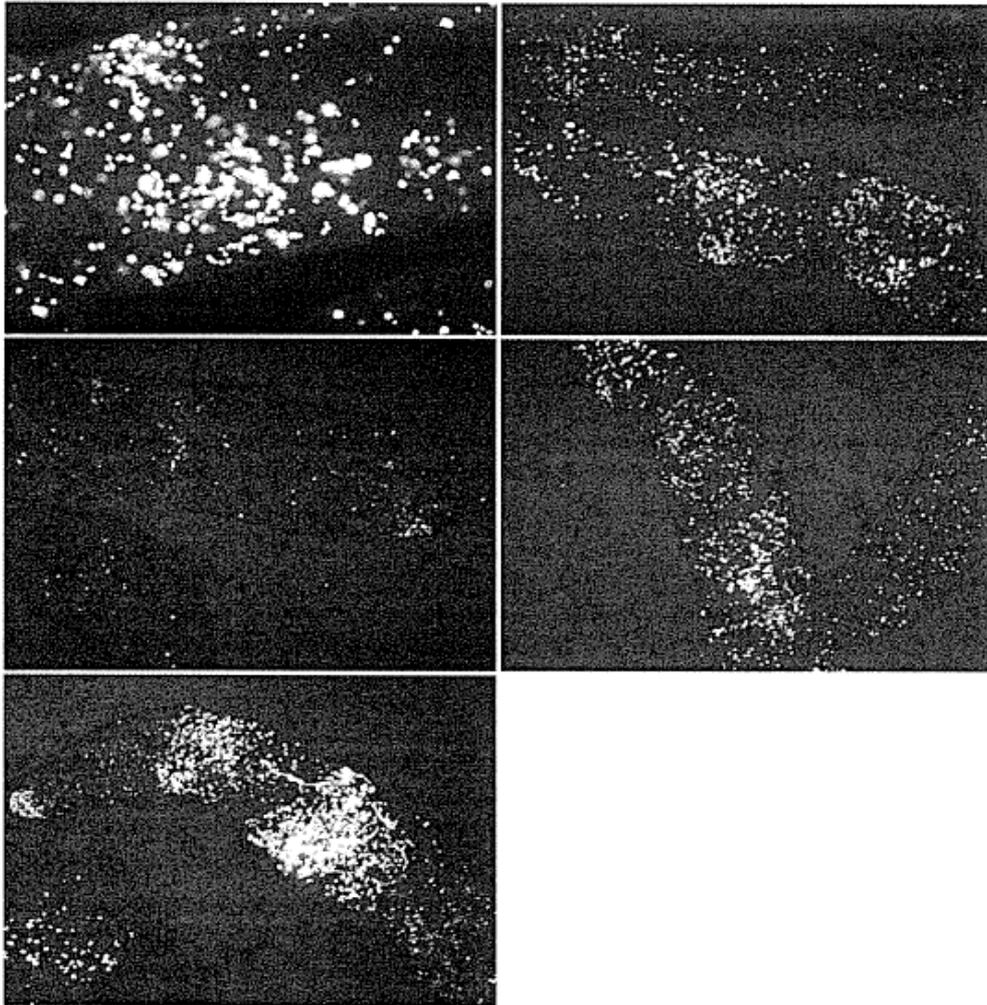


Figura 4

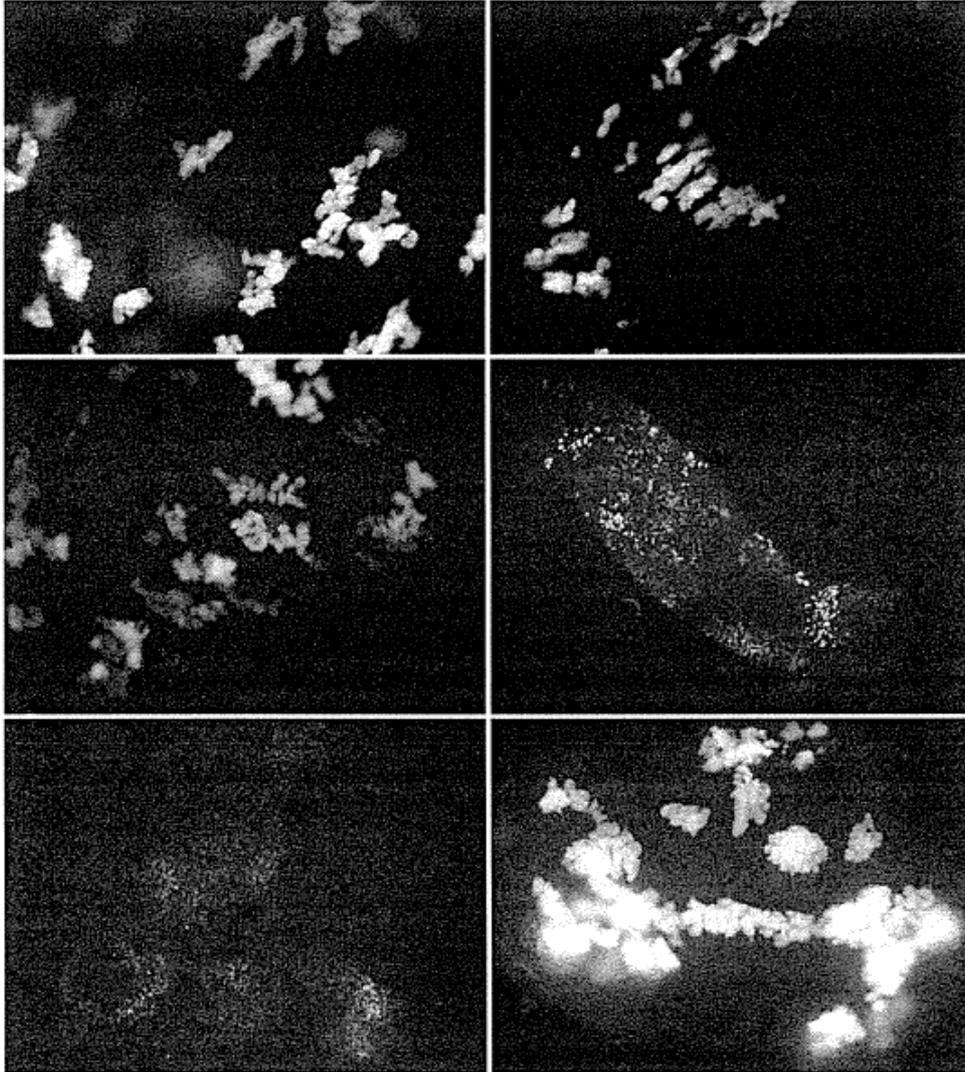


Figura 5

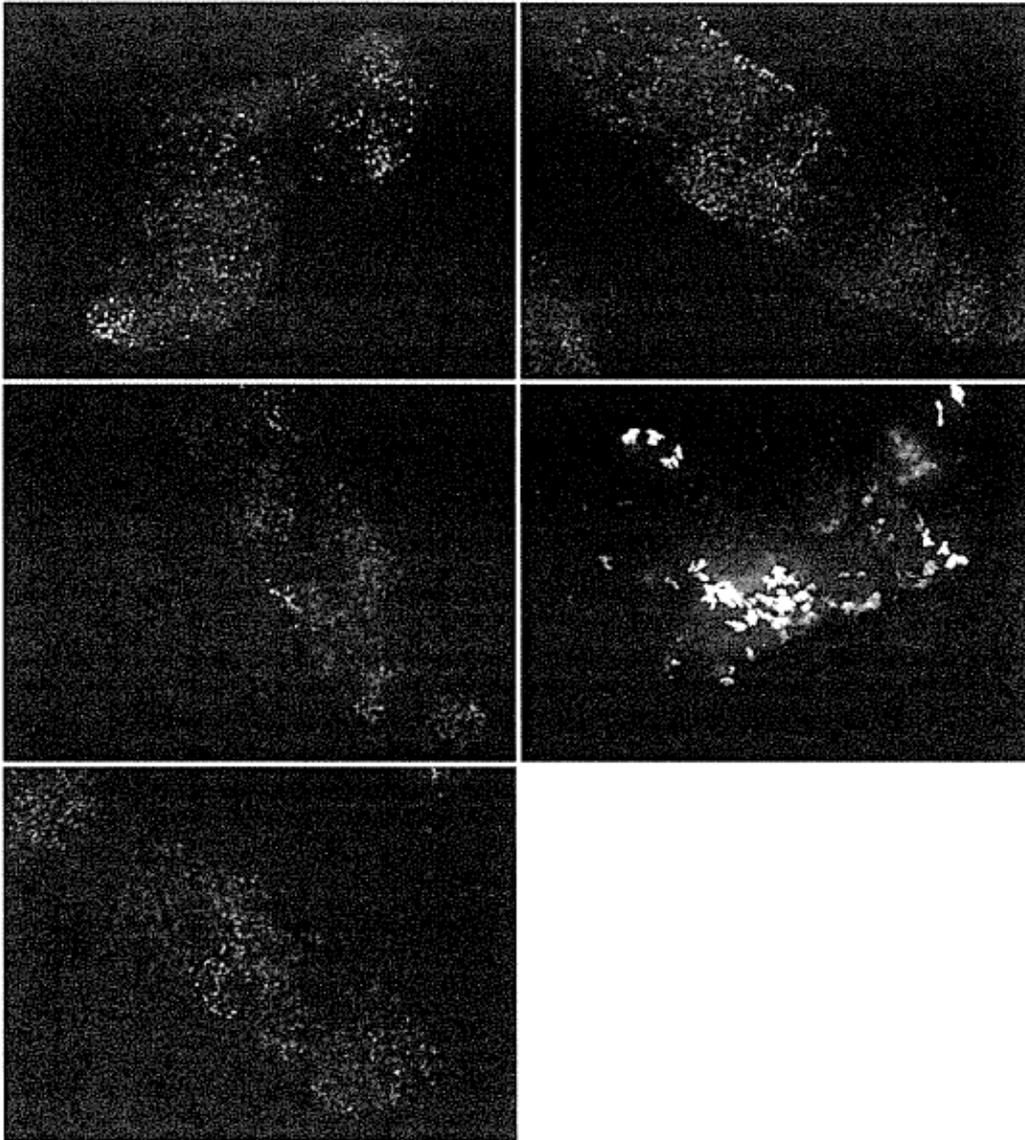


Figura 6

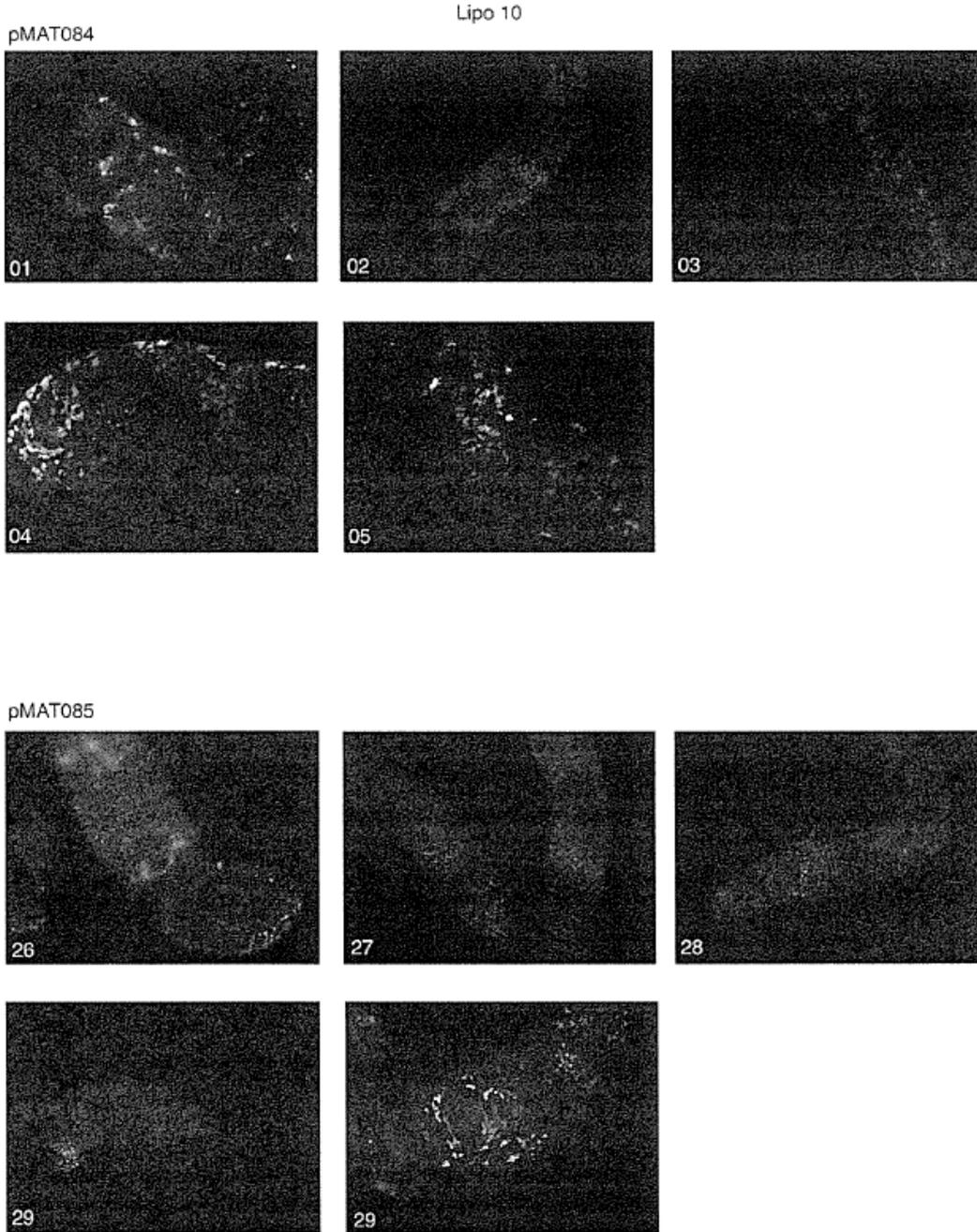


Figura 7

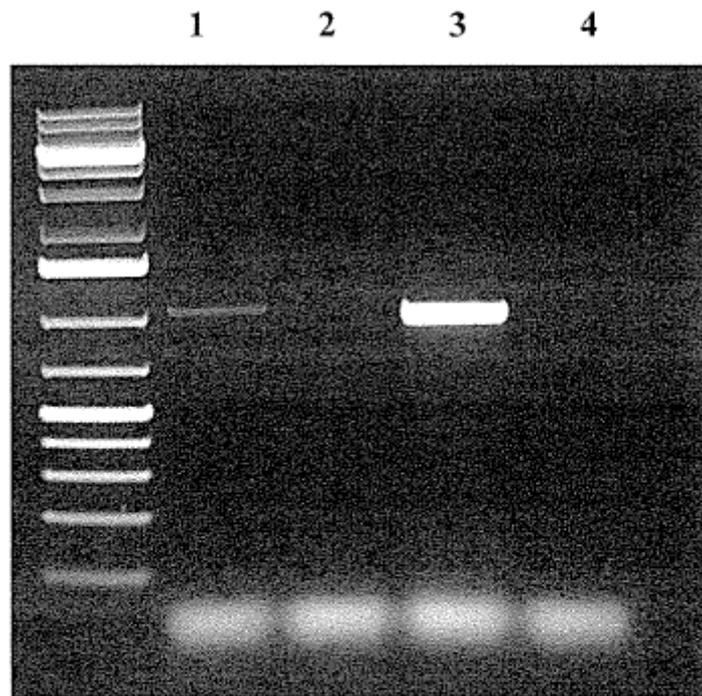


Figura 8