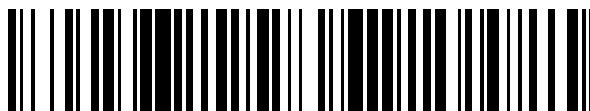


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 738**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/873 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2011** **PCT/US2011/039997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011** **WO11156723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2011** **E 11729215 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 2579711**

54 Título: **Producción de animales hembra xy fértiles a partir de células es xy**

30 Prioridad:

11.06.2010 US 353896 P
10.06.2011 US 201113157728

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
18.10.2019

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

AUERBACH, WOJTEK;
DECHIARA, THOMAS;
POUEYMIROU, WILLIAM;
FRENDEWEY, DAVID y
VALENZUELA, DAVID

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 727 738 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

Producción de animales hembra xy fértiles a partir de células es xy

5 **Campo**

La invención se refiere a la fabricación de animales hembra fértiles derivados de embriocitoblastos ("ES") XY y que tienen un cariotipo XY. En una realización particular, se describen métodos y composiciones para preparar ratones hembra XY fértiles a partir de células ES de murino donante XY. Se describen también métodos de fertilización *in vitro* para favorecer la formación de hembras fenotípicas.

Antecedentes

Casi todas las líneas de células ES empleadas comúnmente para preparar ratones genéticamente modificados son líneas de células ES de machos genotípicos (XY). Como resultado, en la generación de F0, todos los animales XY son machos. La mayoría de modificaciones genéticas se llevan a cabo dirigiendo las células ERS XY para crear una modificación de uno de los dos alelos existentes, es decir, la célula ES de ratón donante es heterocigótica para la modificación genética. Sin embargo, es a menudo deseable obtener un ratón que es homocigótico para la modificación genética. Debido a que los ratones hembra no completamente derivados de células ES se crían en la generación F0 que comprende la modificación, el macho F0 se aparea normalmente con una hembra (por ejemplo, una hembra consanguínea emparejada) para generar una camada en la que al menos una hembra (una hembra F1) puede ser heterocigótica para la modificación genética. La hembra F1 heterocigótica se entrecruza a continuación con un macho F1 heterocigótico, para obtener una descendencia homocigótica. Dichos requerimientos reproductivos representan pasos costosos y laboriosos. Es deseable generar una pareja reproductiva en una generación F0, o al menos generar una hembra F0 que se derive en gran parte o completamente de la célula ES donante (macho XY).

Son necesarios en la técnica métodos y composiciones para preparar un animal hembra fértil en la generación F0 de una célula ES de un macho donante (XY) y un embrión hospedador.

Sumario

La invención proporciona un método para preparar un ratón XY fenotípicamente hembra fértil en una generación F0, que comprende:

(a) mantener una célula ES de ratón XY donante en un medio que comprende (i) un medio base que presenta una osmolalidad de no más de 322 mOsm/kg, y (ii) suplementos adecuados para mantener las células ES de ratón en el cultivo;

(b) introducir la célula ES de ratón XY donante e la etapa (a) en el embrión de ratón hospedador en la etapa premórula; (c) gestar el embrión hospedador; y, (d) obtener una descendencia de ratón en la generación F0 que comprende un ratón XY fenotípicamente hembra F0, en el que, al alcanzar la madurez sexual, el ratón XY fenotípicamente hembra F0 es fértil.

La invención proporciona además un método para aumentar la eficacia de generar ratones derivados de embriocitoblastos (ES) en una generación F0, que comprende. (a) mantener una célula ES de ratón XY donante en un medio que comprende: (i) un medio base; y (ii) suplementos adecuados para hacer crecer las células ES de ratón en cultivo, en el que el medio base comprende bicarbonato de sodio en una concentración de 1,5-2,2 mg/ml, y que tiene una osmolalidad de 218-322 mOsm/kg; (b) introducir la célula ES de ratón XY donante de la etapa (a) en un embrión de ratón hospedador en la etapa premórula; (c) gestar el embrión de ratón hospedador; y (d) obtener la descendencia de ratón XY F0, en el que la relación de crías derivadas de células ES a crías totales generadas en la generación F0 es mayor que la relación de crías derivadas de células ES a crías totales generadas en la generación F0 producidas a partir de células ES XY donantes mantenidas en un medio que tiene una osmolalidad de más de 322 mOsm/kg.

En un aspecto, se describe un método para preparar un animal no humano hembra fértil a partir de una célula de donante XY, que comprende: (a) introducir una célula de donante XY no humano en un embrión hospedador no humano para formar un embrión quimérico; y, (b) gestar el embrión quimérico para formar un animal hembra no humano, en el que el animal hembra no humano es XY y tras alcanzar la madurez sexual es fértil.

En un aspecto, el animal no humano es un ratón.

En un aspecto, el animal hembra XY no humano se forma en la generación F0. En un aspecto, el animal XY hembra no humano en la generación F0 es un ratón y tiene un color de pelaje 100 % derivado de la célula donante. En un aspecto, el animal XY hembra no humano formado en la generación F0 está al menos un 90 %, un 92 %, un 94 %, un 96 %, un 98 %, o 99,8 % derivado de la célula de donante XY. En un aspecto, el animal XY hembra no humano en la generación F0 está derivado aproximadamente un 100 % de la célula donante. En un aspecto, la contribución de una

célula embrionaria hospedadora a un animal XY hembra no humano en la generación F0 se determina mediante un ensayo cuantitativo que es capaz de detectar 1 célula en 2.000 (0,05 %) y ningún tejido del animal XY hembra es positivo para la contribución de la célula embrionaria hospedadora.

5 En una realización, la célula donante comprende una modificación genética. En una realización, la modificación genética comprende una delección completa o en parte de una secuencia de ácido nucleico endógeno; una sustitución de uno o más ácidos nucleicos; una sustitución de una secuencia de ácido nucleico endógeno, por ejemplo, un gen, en todo o en parte con una secuencia de ácido nucleico heterólogo; una inactivación génica; y/o, una inserción de una secuencia específica.

10 En un aspecto, el método comprende además una etapa de cría de un macho XY de una generación F0, heterocigótico para la modificación genética con una hembra XY de generación F0 heterocigótica para la modificación genética (por ejemplo, un hermano), y obtener de dicha cría un animal de una generación F1, homocigótico para la modificación genética.

15 En un aspecto, la célula de donante XY antes de la introducción en el embrión hospedador se mantiene en un medio que comprende medio base y suplementos, en el que el medio base presenta una característica seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) una osmolalidad de aproximadamente 250-310 mOsm/kg; (b) una conductividad de aproximadamente 11-13 mS/cm; (c) una sal de metal alcalino y una sal de haluro en una concentración de aproximadamente 60-105 mM; (d) una concentración de sal de ácido carbónico de aproximadamente 20-30 mM; (e) una concentración total de sal de haluro de metal alcalino y una concentración de sal de ácido carbónico de no más de aproximadamente 85-130 mM; y (f) una combinación de los mismos.

25 En una realización, los suplementos comprenden componentes para mantener las células ES en cultivo. En una realización, los suplementos comprenden uno o más de suero de feto de bovino (FBS), glutamina, antibiótico(s), piruvato, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol, y LIF.

30 En un aspecto, el medio base es un DMEM con una concentración baja en sal. En un aspecto específico, el DMEM con una concentración baja en sal tiene una concentración de NaCl de 85-130 mM. En un aspecto, el medio base es un DMEM de osmolalidad baja. En una realización específica, el DMEM de osmolalidad baja tiene una osmolalidad de 250-310 mOsm/kg. En un aspecto, el medio base es un DMEM de conductividad baja. En un aspecto específico, el DMEM de conductividad baja tiene una conductividad de 11-13 mS/cm.

35 En una realización, la célula donante se mantiene en el medio base enumerado más suplementos antes de la introducción en el embrión hospedador durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 días, 1 semana, 8, 9, 10, 11, o 12 días, 2 semanas, 3 semanas, o 4 semanas o más. En una realización específica, la célula donante se mantiene en el medio base más suplementos durante al menos una semana antes de la introducción en el embrión hospedador. En una realización específica, la célula donante se mantiene en el medio base más suplementos durante 2-4 semanas antes de la introducción en el embrión hospedador.

40 En un aspecto, el embrión hospedador es un embrión que está en una etapa de 2 células, una etapa de 4 células, una etapa de 8 células, una etapa de 16 células, una etapa de 32 células, o una etapa de 64 células. En otro aspecto, el embrión hospedador es un blastocisto. En un aspecto, el embrión hospedador está en una etapa seleccionada entre una etapa premórula, una etapa de mórula, una etapa de mórula sin compactar, y una etapa de mórula compactada.

45 En un aspecto, la etapa embrionaria se selecciona entre una Etapa 1 Theiler (TS1), una TS2, una TS3, una TS4, una TS5 y una TS6, con referencia a las etapas Theiler descritas en Theiler (1989) "The House Mouse: Atlas of Mouse Development," Springer-Verlag, Nueva York. En un aspecto específico, la etapa Theiler se selecciona entre TS1, TS2, TS3, y una TS4. En un aspecto, el embrión comprende una zona pelúcida, y la célula donante es una célula ES que se introduce en el embrión a través de un orificio en la zona pelúcida.

50 En un aspecto, el embrión comprende un embrión preblastocisto. En un aspecto, el embrión es un embrión que está en una etapa de mórula. En un aspecto específico, se agrega el embrión que está en una etapa de mórula. En un aspecto, el embrión es un embrión sin zona.

55 En un aspecto, la célula de donante XY se selecciona entre una célula ES, un citoblasto pluripotente inducido (iPS), una célula pluripotente, y una célula totipotente. En un aspecto específico, la célula de donante XY es una célula ES de ratón y el embrión hospedador es un embrión de ratón.

60 En una realización, la célula de donante XY es una célula ES procedente de una variedad de ratón consanguínea. En una realización, la célula de donante XY es una célula ES de una variedad de ratón híbrido o criado mediante cruce de razas.

65 En un aspecto, el embrión hospedador es un embrión de ratón hospedador. En una realización, el embrión de ratón hospedador es de una variedad consanguínea, en otra realización de una variedad híbrida o criada mediante cruce de razas. En un aspecto, la célula donante es una célula donante de ratón. En una realización, el embrión hospedador y la célula donante son ambos de ratón, y cada uno se selecciona independientemente de un ratón que es de la

variedad 129, la variedad C57BL/6, una mezcla de 129 y C57BL/6, una variedad BALB/c, o una variedad Swiss Webster. En una realización específica, el ratón tiene un 50 % de 129 y un 50 % de C57BL/6. En una realización, el ratón es de una variedad 129 seleccionada entre el grupo que consiste en una variedad que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing et al. (1999) Nomenclatura revisada para los ratones de la variedad 129, Mammalian Genome 10:836). En una realización, el ratón es de la variedad C57BL, en una realización específica se selecciona entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola. En una realización específica, el ratón es una mezcla de la variedad 129 anteriormente mencionada y una variedad C57BL/6 anteriormente mencionada. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las variedades 129 anteriormente mencionada, o una mezcla de las variedades BL/6 anteriormente mencionadas. En una realización específica, la variedad 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac).

En una realización, el ratón hembra con fenotipo XY produce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 camadas de ratones vivos durante toda su vida. En una realización, el ratón hembra XY produce al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 crías por camada. En una realización, el ratón hembra XY produce aproximadamente 4-6 crías por camada. En una realización, el ratón hembra XY produce 2-6 camadas, en el que cada camada tiene al menos 2, 3, 4, 5, o 6 crías. En una realización, aproximadamente un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, o 50 % de las crías son crías hembra XY. En una realización específica, aproximadamente un 15 %-25 % son crías hembra XY.

En un aspecto, se describe un método para preparar un ratón que es homocigótico para una modificación genética, empleando una célula ES XY que es heterocigótica para la modificación genética. En un aspecto, el método comprende modificar genéticamente una célula ES de donante XY para formar una célula ES de donante XY heterocigótica, manteniendo la célula ES de donante XY heterocigótica en un medio de conductividad baja u osmolalidad baja y/o con una concentración baja de sal, introduciendo la célula ES de donante XY heterocigótica en un embrión hospedador premórula, gestando el embrión hospedador, obteniendo tras la gestación un ratón XY hembra de generación F0 fértil que comprende la modificación heterocigótica y está, al menos en parte, derivada de la célula ES donante, y obtener tras la gestación un ratón XY macho de generación F0 fértil que comprende la modificación heterocigótica y que está, al menos en parte, derivado de la célula ES donante y hacer criar al macho F0 y a la hembra F0 para obtener una descendencia F1 que comprende una modificación homocigótica.

En un aspecto, el ratón XY hembra de generación F0 y el ratón XY macho de generación F0 está al menos un 20 % o más derivado de la célula ES donante. En un aspecto, el ratón XY hembra F0 está al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, u 80 % derivado de la célula ES donante.

En un aspecto, el ratón XY hembra de generación F0 y/o el ratón XY macho está al menos un 90 % derivado de la célula ES donante. En un aspecto, el ratón XY hembra de generación F0 está al menos un 92 %, un 94 %, un 96 %, un 98 %, un 99 %, u 99,8 % derivado de la célula ES donante. En un aspecto, el ratón XY hembra F0 y/o el ratón XY macho F0 tiene un color del pelaje que está un 100 % derivado de la célula ES.

En un aspecto, el ratón de generación F0 comprende un oocito XY.

En un aspecto, el ratón con una descendencia de generación F1 comprende un genoma completamente derivado de la célula ES donante.

En un aspecto, la frecuencia de cruces de ratones macho de generación F0 y ratones hembra de generación F0 que proporcionan un aumento de ratones derivados completamente de células ES es del 100 %.

En un aspecto, se describe un método para generar una camada de crías de ratón, que comprende introducir células Es de donante XY preparadas de acuerdo con la presente divulgación en embriones hospedadores de ratón, gestar los embriones en un ratón adecuado, y obtener una camada de crías de ratón que comprende al menos una cría de ratón hembra XY que tras alcanzar la madurez sexual es un ratón hembra XY fértil.

En un aspecto, El porcentaje de crías recién nacidas de ratón hembra XY que tras alcanzar la madurez sexual son fértiles es aproximadamente de un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, 45 % o 50 %. En un aspecto específico, el porcentaje es aproximadamente de un 15-25 %.

En un aspecto, se describe un método para mantener una célula ES XY, en el que la célula ES XY se mantiene en condiciones que promueven o favorecen el desarrollo de un ratón XY hembra tras la introducción de la célula ES XY en un embrión hospedador y tras la gestación en un ratón hembra adecuado. El método comprende mantener la célula ES de macho en un medio de cultivo adecuado que comprende un medio base y suplementos, en el que el medio base presenta una osmolalidad de aproximadamente 240-320 mOsm/kg, una conductividad de aproximadamente 10-14 mS/cm, una concentración de sal de haluro de metal alcalino de aproximadamente 50-105 mM, una concentración de sal de ácido carbónico de 10-40 mM y una concentración sal de metal alcalino combinado y una concentración de sal de ácido carbónico de aproximadamente 80-140 mM. En un aspecto, la célula ES XY se mantiene en el medio (con suplementos para mantener las células ES) durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, o 6 días, o 1 semana, 8, 9, 110,

11, o 12 días, 2 semanas, 3 semanas, o 4 semanas antes de la introducción en un embrión hospedador. En un aspecto específico, la célula ES se mantiene en el medio (medio base con una concentración baja de sal con suplementos para mantener las células ES) durante aproximadamente 2-4 semanas antes de la introducción en el embrión hospedador.

5 En una realización, el medio base presenta una osmolalidad de no más de aproximadamente 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250, o 240 mOsm/kg. En una realización, el medio base presenta una osmolalidad de no más de aproximadamente 240-320, 250-310, o 260-300 mOsm/kg. En una realización específica, el medio base presenta una osmolalidad de aproximadamente 270 mOsm/kg.

10 En un aspecto, el medio base presenta una conductividad de no más de aproximadamente 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, o 14,0 mS/cm. En un aspecto, el medio base presenta una conductividad de no más de aproximadamente 10-14 mS/cm u 11-13 mS/cm. En un aspecto específico, el medio base presenta una conductividad de aproximadamente 12-13 mS/cm.

15 En una realización específica, el medio base presenta una conductividad de aproximadamente 12-13 mS/cm y una osmolalidad de aproximadamente 260-300 mOsm/kg. En un aspecto específico adicional, el medio base comprende cloruro sódico a una concentración de aproximadamente NaCl 90 mM. En un aspecto específico adicional, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 70-95 mM. En un aspecto específico adicional, el medio base comprende bicarbonato de sodio a una concentración de menos de aproximadamente 35 mM. En un aspecto específico adicional, la concentración de bicarbonato de sodio es aproximadamente de 20-30 mM.

25 En un aspecto, el medio base presenta una concentración de una sal de un metal alcalino y un haluro de no más de aproximadamente 100 mM. En un aspecto, la sal del metal alcalino y el haluro es NaCl. En un aspecto, la concentración de la sal del metal alcalino y el haluro no es mayor de 90, 80, 70, 60, o 50 mM. En un aspecto, la concentración en el medio base de la sal del metal alcalino y el haluro es aproximadamente de 60-105, 70-95, u 80-90 mM. En un aspecto específico, la concentración es aproximadamente 85 mM.

30 En un aspecto, el medio base presenta una concentración de una sal de ácido carbónico. En un aspecto, la sal de ácido carbónico es una sal de sodio. En un aspecto, la sal de sodio es bicarbonato de sodio. En un aspecto, la concentración de la sal de ácido carbónico en el medio base no es mayor de 40, 35, 30, 25, o 20 mM. En un aspecto, la concentración de sal de ácido carbónico en el medio base es aproximadamente de 10-40, en otro aspecto aproximadamente 20-30 mM. En un aspecto específico, la concentración es aproximadamente de 25 o 26 mM.

35 En un aspecto, la suma de la concentración de la sal del metal alcalino y el haluro y la sal del ácido carbónico en el medio base no es más de 140, 130, 120, 110, 100, 90, u 80 mM. En un aspecto, la suma de la concentración de la sal del metal alcalino y el haluro y de la sal de ácido carbónico en el medio base es aproximadamente de 80-140, 85-130, 90-120, 95-120, o 100-120 mM. En un aspecto específico, la suma de la concentración de la sal del metal alcalino y el haluro y de la sal de ácido carbónico en el medio base es aproximadamente de 115 mM.

40 En un aspecto, la relación molar de la sal del metal alcalino y del haluro y la sal de ácido carbónico es mayor de 2,5. En un aspecto, la relación es aproximadamente de 2,6-4,0, 2,8-3,8, 3-3,6, o 3,2-3,4. En un aspecto, la relación es de 3,3-3,5. En una realización específica, la relación es de 3,4.

45 En un aspecto, el medio base presenta una osmolalidad de aproximadamente 250-310 mOsm/kg, y una concentración de una sal de un metal alcalino y un haluro de aproximadamente 60-105 mM. En un aspecto adicional, el medio base tiene una concentración de una sal de ácido carbónico de aproximadamente 20-30 mM. En un aspecto adicional, la suma de las concentraciones de la sal de un metal alcalino y el haluro y de la sal de ácido carbónico es aproximadamente de 80-140 mM. En un aspecto adicional, la conductividad del medio base es aproximadamente de 12-13 mS/cm.

50 En un aspecto, se divulga un método para mantener una célula ES de donante XY en cultivo, en las condiciones que se describen en el presente documento, en el que en la siguiente introducción de la célula ES de donante XY en un embrión hospedador para formar un embrión quimérico y la gestación del embrión quimérico en un animal adecuada, el embrión quimérico se desarrolla en una cría de ratón que tiene al menos un 90 % de XY y es una hembra que, tras alcanzar la madurez sexual, es fértil.

En un aspecto, la cría de ratón tiene al menos un 92 %, un 94 %, un 96 %, un 98 %, o, 99,8 % de XY.

60 En un aspecto, se describe un método para preparar un animal hembra XY fértil, que comprende mantener una célula de donante XY en un medio que comprende un medio base con una concentración baja de sal antes de la introducción de la célula donante en un embrión hospedador, introducir la célula donante en el embrión hospedador, gestar el embrión hospedador en un animal adecuado a término, y tras la gestación obtener un animal hembra XY procedente del anterior, en el que tras alcanzar la madurez sexual, el animal XY hembra es fértil.

65 En un aspecto, la célula de donante XY es una célula ES de ratón, y el embrión hospedador es un embrión de un ratón

hembra XX.

En un aspecto, el cultivo en el que la célula donante se mantiene comprende un medio base que se describe en el presente documento, y uno o más suplementos adecuados para mantener las células ES de ratón en cultivo. En un aspecto específico, el uno o más suplementos adecuados para mantener una célula ES de ratón en cultivo son FBS (90 ml de medio base de FBS/0,5 l), glutamina (2,4 mmoles/0,5 l de medio base, piruvato de sodio (0,6 mmoles/0,5 l de medio base), aminoácidos no esenciales (< 0,1 mmol/0,5 l de medio base), 2-mercaptoetanol, LIF, y uno o más antibióticos.

En un aspecto, la célula donante se mantiene en un medio con un medio base con una concentración baja de sal durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 días, o 1 semana, 8, 9, 10, 11, o 12 días, 2 semanas, 3 semanas, o 4 semanas, antes de introducir la célula donante en el embrión hospedador. En un aspecto específico, la célula donante se mantiene en un medio con un medio base con una concentración baja de sal al menos 2-4 semanas antes de la introducción de la célula donante en el embrión hospedador.

En un aspecto, la célula donante se mantiene (por ejemplo, congelada) en un medio que comprende un medio base con una concentración baja de sal y la célula donante se descongela y se mantiene en el medio que comprende un medio base con una concentración baja de sal durante al menos 1, 2, 3, o 4 o más días antes de introducir la célula donante en el embrión hospedador. En un aspecto específico, la célula donante se pasa al menos una vez en un medio que comprende un medio base con una concentración baja de sal, la célula se congela en el medio que comprende el medio base con la concentración baja de sal y la célula se descongela en un medio que comprende un medio base con una concentración baja de sal y se hace crecer durante 1, 2, 3, 4, 5, o 6 días o más, o 1 semana, 8, 9, 10, 11, o 12 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más, antes de la introducción en el embrión hospedador.

En una realización, la célula donante se mantiene durante un periodo de uno, dos, tres, o cuatro días antes de la introducción en el embrión hospedador. En una realización, la célula donante se mantiene en el medio que comprende el medio base enumerado durante un periodo de 3 días.

En un aspecto, se describe un método para preparar una pareja reproductora de ratones fértiles, derivados cada uno completamente de una célula ES donante, en la misma generación F0, que comprende: mantener las células ES de ratón donante de XY macho en cultivo que comprende un medio base y suplementos, como se describe en el presente documento, en el que las células ES se mantienen en el medio base y suplementos durante un periodo de al menos un día; introducir las células ES en embriones hospedadores (por ejemplo, de ratones XX) para formar embriones quiméricos; gestar los embriones quiméricos en un ratón adecuado a término; y, obtener del ratón adecuado una camada de crías de ratón que comprende una generación F0 de ratones XY macho fértiles completamente derivados de una célula ES donante y que comprenden un ratón XY hembra fértil de generación F0 derivado completamente de una célula ES donante.

En un aspecto, las células ES donantes comprenden una modificación genética. En una realización, las células ES donantes comprenden una modificación genética que es heterocigótica. En un aspecto, las células ES donantes comprenden una modificación genética heterocigótica, el ratón macho fértil de generación F0 y el ratón XY hembra fértil de generación F0 y cada heterocigoto para la modificación genética, y el macho fértil de generación F0 y la hembra fértil de generación F0 se reproducen entre sí y producen una descendencia que es un ratón de generación F1 homocigótico para la modificación genética.

En un aspecto, las células ES se mantienen durante un periodo de dos días, tres días, o cuatro días o más.

En un aspecto, se describe un método para preparar un ratón XY hembra fértil en una generación F0, que comprende las etapas de (a) mantener una célula ES de ratón donante de XY en un medio que comprende un medio base, y suplementos adecuados para mantener las células ES en cultivo, (b) introducir la célula ES de ratón donante de XY en un embrión hospedador, (c) gestar el embrión hospedador, y (d) obtener una descendencia de ratón hembra XY, en la que tras alcanzar la madurez sexual, el ratón hembra XY es fértil. El medio base de acuerdo con este aspecto presenta una o más características seleccionadas entre (1) una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg a menos de 329 mOsm/kg, (2) una conductividad de aproximadamente 11-13 mS/cm, (3) una de sal de un metal alcalino y un haluro en una concentración de aproximadamente 50-110 mM, (4) una concentración de sal de ácido carbónico de aproximadamente 17-30 mM, y (5) una concentración total de una sal de haluro de metal alcalino y de sal de ácido carbónico de aproximadamente 85-130 mM.

En una realización, la célula ES de ratón donante de XY comprende una modificación genética. En algunas realizaciones, la modificación genética comprende una o más de una secuencia de ácido nucleico endógeno, una sustitución de uno o más ácidos nucleicos, una sustitución de una secuencia de ácido nucleico endógeno con una secuencia de ácido nucleico heterólogo, una inactivación génica, y una inserción de una secuencia específica. En una realización particular, la modificación genética es una inactivación génica de un gen STEAP2.

En una realización, el medio base contiene entre otros (presenta) 50 ± 5 mM NaCl y 26 ± 5 mM de carbonato, con una osmolalidad de 218 ± 22 mOsm/kg. En una realización específica, el medio base presenta aproximadamente 3 mg/ml

de NaCl y 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico, con una osmolalidad de aproximadamente 218 mOsm/kg.

En otro aspecto, el medio base presenta 87 ± 5 mM de NaCl y 18 ± 5 mM, con una osmolalidad de 261 ± 26 mOsm/kg. En un aspecto específico, el medio base presenta aproximadamente 5,1 mg/ml de NaCl y 1,5 mg/ml de bicarbonato sódico, con una osmolalidad de aproximadamente 261 mOsm/kg.

En otra realización, el medio base presenta 110 ± 5 mM de NaCl y 18 ± 5 mM de carbonato, con una osmolalidad de 294 ± 29 mOsm/kg. En una realización específica, el medio base presenta aproximadamente 6,4 mg/ml de NaCl y 1,5 mg/ml de bicarbonato sódico, con una osmolalidad de aproximadamente 294 mOsm/kg.

En otra realización, el medio base presenta 87 ± 5 mM de NaCl y 26 ± 5 mM de carbonato, con una osmolalidad de aproximadamente 270 ± 27 mOsm/kg. En una realización específica, el medio base presenta aproximadamente 5,1 mg/ml de NaCl y 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico, con una osmolalidad de aproximadamente 270 mOsm/kg.

En otro aspecto, el medio base presenta 87 ± 5 mM de NaCl, 26 ± 5 mM de carbonato, y 86 ± 5 mM de glucosa, con una osmolalidad de 322 ± 32 mOsm/kg. En un aspecto específico, el medio base presenta aproximadamente 5,1 mg/ml de NaCl, aproximadamente 2,2 mg/ml de bicarbonato de sodio, y aproximadamente 15,5 mg/ml de glucosa, con una osmolalidad de aproximadamente 322 mOsm/kg.

En un aspecto, se describe un método para producir un ratón transgénico homocigótico para una modificación genética en la generación F1, que comprende las etapas de (a) cruzar un ratón hembra fértil XY F0 producido de acuerdo con el método anterior con un ratón macho XY de la cohorte F0 y (b) obtener un ratón de la descendencia F1 que sea heterocigótico para la modificación genética. De acuerdo con este aspecto, el ratón hembra fértil XY F0 y el ratón macho XY F0 son cada uno heterocigóticos para la modificación genética. En algunos aspectos, la modificación genética comprende una o más de una secuencia de ácido nucleico endógeno, una sustitución de uno o más ácidos nucleicos, una sustitución de una secuencia de ácido nucleico endógeno con una secuencia de ácido nucleico heterólogo, una inactivación génica, y una inserción de una secuencia específica.

En una realización específica, el ratón hembra fértil XY F0 se prepara de acuerdo con el método anterior en el que el medio base presenta 50 ± 5 mM de NaCl y 26 ± 5 mM de carbonato, con una osmolalidad de 218 ± 22 mOsm/kg. En una realización particular, el medio base presenta aproximadamente 3 mg/ml de NaCl y 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico, con una osmolalidad de aproximadamente 218 mOsm/kg.

En un aspecto, se describe un ratón transgénico homocigótico para una modificación genética, que se produce de acuerdo con el método anterior.

En un aspecto, se describe un ratón XY hembra fértil producido de acuerdo con cualquiera de los métodos anteriores. En un aspecto, las células ES, a partir de las cuales se deriva el ratón hembra XY, se mantuvieron en un medio base que presenta 50 ± 5 mM de NaCl y 26 ± 5 mM de carbonato, con una osmolalidad de 218 ± 22 mOsm/kg. En un aspecto específico, el medio base presenta aproximadamente 3 mg/ml de NaCl y 2,2 mg/ml de bicarbonato sódico, con una osmolalidad de aproximadamente 218 mOsm/kg.

Salvo que se indique expresamente, o sea evidente a partir del contexto, cualquier aspecto o realización descritos en el presente documento puede combinarse entre sí.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra los resultados reproductivos usando ratones XY hembras de generación F0 preparados a partir de clones de células ES XY diferentes.

La FIG. 2 muestra la generación de ratones hembra XY de células EX incubadas con DMEM con una concentración baja de sal, DMEM, o DMEM con una concentración baja de sal suplementado con FS (medio acondicionado con Wnt-3a, es decir, medio acondicionado por células L de ratón transfectadas con una construcción de expresión Wnt-3a), NaCl, y NaHCO₃.

Descripción detallada

La frase "medio base" o "medios base" incluye un medio base conocido en la técnica (por ejemplo, DMEM) que es adecuado para su uso (con suplementos añadidos) en crecimiento o en el mantenimiento de células ES en cultivo. Los medios base adecuados para preparar una hembra XY fértil (es decir, "DMEM con una concentración baja de sal" difiere de los medios base normalmente usados para mantener las células ES en cultivo. A fines de describir los medios base en general, los medios base que no son adecuados para preparar hembras XY fértiles se describen en esta sección como "DMEM" y en la siguiente tabla (por ejemplo, medios DMEM típicos). A fines de describir los medios base adecuados para preparar hembras XY fértiles, se usa la frase "DMEM con una concentración baja de sal". Se articulan en el presente documento las diferencias entre los medios base normalmente usados para mantener las células ES en cultivo (por ejemplo, DMEM) y los medios base adecuados para preparar hembras XY fértiles (por

ejemplo, (DMEM con una concentración baja de sal". La frase "DMEM con una concentración baja de sal" se usa por conveniencia; el DMEM adecuado para preparar hembras XY fértiles presenta características no limitadas a la "concentración baja de sal" pero incluye aquellas descritas en el presente documento. Por ejemplo, el DMEM que se muestra en la Tabla 1 puede prepararse de forma adecuada para las hembras XY fértiles alterando las concentraciones de cloruro de sodio y/o bicarbonato de sodio que se proporcionan en el presente documento, que darán también como resultado una osmolalidad diferente y una conductividad diferente en comparación con el DMEM que se muestra en la Tabla 1. Un ejemplo de medio base es el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), en diversas formas (por ejemplo, DMEM de Invitrogen, n.º de Cat. 11971-025) (Tabla 1). Está comercialmente disponible un DMEM con una concentración baja de sal como KO-DMEM™ (Invitrogen n.º de Cat. 10829-018). El medio base está suplementado normalmente con numerosos suplementos conocidos en la materia cuando se usa para mantener células en cultivo para su uso como células donantes. Dichos suplementos están indicados como "suplementos" o ("+" suplementos" en esta divulgación.

Tabla 1: Medios base de DMEM para mantener las células ES		
Componente	mg/l	mM
Glicina	30	0,4
L-Arginina•HCl	84	0,398
L-Cistina•2HCl	63	0,201
L-Glutamina	584	4
L-HistidinaHCl•H ₂ O•	42	0,2
L-isoleucina	105	0,802
L-leucina	105	0,802
L-Lisina•HCl	146	0,798
L-Metionina	30	0,201
L-Fenilalanina	66	0,4
L-Serina	42	0,4
L-Treonina	95	0,798
L-Triptófano	16	0,0784
Sal dihidratada de L-Tirosina disodio	104	0,398
L-valina	94	0,803
Cloruro de colina	4	0,0286
Pantotenato de D-calcio	4	8,39 x 10 ⁻³
Ácido fólico	4	9,07 x 10 ⁻³
Niacinamida	4	0,0328
Piridoxina•HCl	4	0,0196
Riboflavina	0,4	1,06 x 10 ⁻³
Tiamina•HCl	4	0,0119
i-Inositol	7,2	0,04
Cloruro de calcio (CaCl ₂) (anhidro)	200	1,8
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O)	0,1	2,48 x 10 ⁻⁴
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) (anhidro)	97,67	0,814
Cloruro potásico (KCl)	400	5,33
D-Glucosa (Dextrosa)	4500	25
Rojo fenol	15	0,0399

(continuación)

NaCl/NaHCO₃ Contenido de DMEM		
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	3700	44,05
Cloruro de sodio (NaCl)	6400	110,34
NaCl/NaHCO₃ Contenido de DMEM con concentración baja		
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	< 3700	< 44,05
Cloruro de sodio (NaCl)	< 6400	< 110,34

El término "suplementos" o la frase "+ suplementos", incluye elementos añadidos al medio base para hacer crecer o mantener las células donantes en cultivo, por ejemplo, para mantener la pluripotencia o la totipotencia de las células donantes en cultivo. Por ejemplo, los suplementos de los medios o el mantenimiento de células ES no humanas en cultivo incluyen suero de feto de bovino (FBS), glutamina, penicilina y estreptomicina (por ejemplo, penstrep), sales de piruvato (por ejemplo, piruvato de sodio), aminoácidos no esenciales (por ejemplo, MEM NEAA), 2-mercaptoetanol, y LIF.

En diversos aspectos de los medios para mantener células donantes no humanas en cultivo, se añaden hasta aproximadamente 500 ml de medio base los siguientes suplementos: aproximadamente 90 ml de FBS (por ejemplo de Hylcone FBS n.º Cat. SH30070.03), aproximadamente 2,4 milimoles de glutamina (por ejemplo, aproximadamente 12 ml de una solución de glutamina 200 mM, por ejemplo, n.º de Cat de Invitrogen 25030-081), penicilina:estreptomicina (por ejemplo, 60.000 unidades de Penicilina G de sodio y 60 mg de sulfato de estreptomicina, con aproximadamente 51 mg de NaCl; por ejemplo, aproximadamente 6 ml de Invitrogen pennstrep, n.º de Cat. 15140-122), aproximadamente 0,6 milimoles de piruvato de sodio 6 ml of 100 mM de piruvato de sodio, Invitrogen n.º de Cat. 11360-070), aproximadamente 0,06 milimoles de aminoácidos no esenciales (por ejemplo, aproximadamente 6 ml de MEM NEAA, por ejemplo, MEM NEAA de Invitrogen n.º Cat. 11140-050) aproximadamente 1,2 ml 2-mercaptoetanol, y aproximadamente 1,2 microgramos de LIF (por ejemplo, aproximadamente 120 microlitros de una preparación de 106 unidades/ml de LIF; por ejemplo, aproximadamente 120 microlitros de Millipore ESGRO™-LIF, n.º de Cat. ESG1107). Cuando se componen medios base para mantener las células Es XY para preparar hembras XY fértiles, normalmente se emplean los mismos suplementos en aproximadamente las mismas cantidades, pero la composición del medio base diferirá (de DMEM, por ejemplo, a partir del medio descrito en la tabla anterior) y la(s) diferencia(s) corresponden a la(s) diferencia(s) que se enseñan en el presente documento.

En algunos aspectos, los suplementos incluyen medios acondicionados con Wnt, por ejemplo, medios acondicionados con Wnt-3a.

El término "animal", en referencia a las células donantes y/o los embriones hospedadores, incluye mamíferos, peces y aves. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, roedores, ratones, ratas, hámsteres, cobayas), ganado (por ejemplo, especies de bovinos, por ejemplo, vacas, novillos, etc.; especies de ovinos, por ejemplo, ovejas, cabras, etc.; y especies de porcinos, por ejemplo, cerdos y jabalíes). Los pájaros incluyen, por ejemplo, pollos, pavos, avestruces, gansos, patos, etc. La frase "animal no humano", en referencia a las células donantes y/o los embriones hospedadores, excluye seres humanos.

En diversos aspectos, la célula donante y/o el embrión hospedador no están entre uno o más de los siguientes: *Akodon spp.*, *Myopus spp.*, *Microtus spp.*, *Talpa spp.* En diversos aspectos, la célula donante y/o el embrión hospedador no están entre ninguna especie de las cuales una característica natural normal es la fertilidad de las hembras XY. En diversos aspectos, cuando está presente una modificación en la célula donante o el embrión hospedador, la modificación genética no es un XYY o XXY, una Tdy-inversión negativa de sexo, Tdy- inversión positiva de sexo, una modificación X0, una aneuploidía, una traslocación o modificación SRY, un genotipo fgf9^{-/-}, o una modificación SOX9.

Visión general

Se conocen en la técnica métodos para preparar animales no humanos, por ejemplo, ratones, a partir de células ES donantes y embriones hospedadores. Las células ES donantes se seleccionan para determinadas características que potencian la capacidad de las células de poblar un embrión hospedador y por tanto contribuyen en parte o en una parte sustancial a un animal formado por las células ES donantes y el embrión hospedador. El animal formado puede ser macho o hembra, basado en gran parte en el genotipo de la célula ES (por ejemplo, XY o XX).

La mayoría de líneas de células para preparar ratones que tengan un genotipo XY macho. Debido a la dominancia del cromosoma Y en la determinación del sexo de mamífero, las células ES XY, cuando se introducen en un embrión hospedador y se gestan, dan como resultado casi ya en la primera generación (F0) animales fenotípicamente machos que son quimeras, es decir, que contienen células derivadas de la célula ES donante macho (XY) derivadas del embrión hospedador, que pueden ser tanto machos (XY) como hembras (XX). en la extensión que los machos

fenotípicos se observan en la generación F0, estos surgen típicamente de la introducción de células ES XY en el embrión XX hembra que da como resultado una quimera cuya contribución a la célula ES es insuficiente para masculinizar el reborde genital embrionario. En la mayoría de los casos dichas quimeras de hembras no producen oocitos derivados de las células ES XY y, por lo tanto, no son capaces de transmitir el genoma de la célula ES en la siguiente generación. En casos raros, las quimeras de hembras no producen los oocitos derivados de las células ES XY; estas hembras pueden transmitir el genoma de la célula ES en la siguiente generación (véase, por ejemplo, Bronson et al. (1995) High incidence of XXY and XYY males among the offspring of female chimeras from embryonic stem cells, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:3120-3123).

Pueden surgir ratones fenotípicamente hembras con un genotipo XY como el resultado de mutaciones específicas. Véase, por ejemplo, Lovell-Badge et al. (1990) XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis determining gene, Tdy, Development 109:635-646; véase también, Colvin et al. (2001) Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9, Cell 104(6):875-889 (hembras Fgf-/- XY que mueren al nacer debido a hipoplasia del pulmón). The South American *Akodon* spp. of rodents comprise XY females (véase, por ejemplo, Hoekstra et al. (2000) Multiple origins of XY female mice (genus *Akodon*): phylogenetic and chromosomal evidence, Proc. R. Soc. Lond. B 267:1825-1831), pero las líneas de células ES de dichos ratones no están generalmente disponible y no se usan ampliamente, si es que se hace.

En algunos casos, por ejemplo, usando el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos números 7.659.442, 7.576.259, 7.294.754, y Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses, Nat. Biotech. 25(1):91-99) es posible obtener ratones de generación F0 que se derivan completamente de la célula ES donante. En circunstancias normales y condiciones experimentales normalizadas, las células ES donantes de XY producen solo ratones derivados completamente de células ES fenotípicamente machos, mientras que las células ES son XX o X (células ES XY que han perdido el cromosoma Y) producen solo ratones derivados completamente de células ES fenotípicamente hembra. Para producir ratones con mutaciones homocigóticas dirigidas a partir de ratones derivados completamente de células ES macho y hembra requiere dos generaciones posteriores de reproducción para producir en primer lugar los machos y hembras de la generación F1 heterocigótica que cuando se entrecruzan tienen el potencial de producir una descendencia homocigótica en la generación F2.

Los inventores han ideado un método para preparar un ratón XY fértil fenotípicamente hembra procedente de una célula donante de XY (por ejemplo, una célula donante de XY derivada de un ratón fenotípicamente macho) y un embrión hospedador adecuado. El método comprende preparar dicho ratón en la generación F0, que permite formar una pareja reproductora (un macho F0 y una hembra F0) en la generación F0. Esto es particularmente útil cuando la célula donante comprende una modificación genética heterocigótica, y se desea un ratón homocigótico. Aunque esta divulgación ilustra la preparación de ratones XY fértiles fenotípicamente hembras procedentes de células ES de ratones donantes de XY, los métodos y composiciones descritos en el presente documento puede aplicarse para preparar animales no humanos fértiles XY hembras a partir de cualquier célula no humana adecuada (por ejemplo, una célula iPS, una célula ES, o una célula pluripotente) y cualquier embrión no humano adecuado.

Se describen métodos y composiciones que incluyen condiciones para mantener una célula donante de tal manera que cuando se usa la célula donante para generar un animal introduciendo la célula donante en un embrión hospedador, el animal generado de esta forma incluye un animal XY fenotípicamente hembra. Un animal XY fértil fenotípicamente hembra incluye un animal que presenta características de fenotípicamente hembra suficientes para ovular y gestar un embrión tras la fertilización de un óvulo producido por ovulación en el animal, incluyendo gestar un embrión a término y parir a un animal nacido vivo.

Los inventores han ideado un método que da como resultado, en diversos aspectos al menos aproximadamente un 10 %, un 15 %, un 20 %, o 25 % o más del tiempo, en el nacimiento de un ratón XY hembra fértil a partir de una célula ES de ratón XY.

Cría de animales

En un aspecto, se describe un método para generar un animal hembra a partir de una célula espermática y de una célula huevo, que comprende mantener la célula espermática y/o la célula huevo en un medio que comprende un medio base con una concentración baja de sal durante uno, dos, tres, o cuatro o más días antes de la fertilización, poner en contacto la célula espermática y la célula huevo en condiciones que permitan la fertilización para formar un huevo fertilizado, implantar el huevo fertilizado en un hospedador adecuado para la gestación, gestar en el hospedador, y obtener una camada que comprende un animal hembra.

En un aspecto, el huevo fertilizado se mantiene además en el medio que comprende un medio base con una concentración baja de sal durante uno, dos, tres, o cuatro o más días antes del implante en el hospedador adecuado.

En un aspecto, se describe un método para favorecer la generación de un animal hembra a partir de un huevo o un embrión fertilizado, que comprende mantener el huevo o embrión fertilizado en un medio que comprende un medio base con una concentración baja de sal durante uno, dos, tres, o cuatro o más días antes del implante en un

hospedador adecuado, implantar el huevo o embrión fertilizado en un hospedador adecuado para la gestación, gestar el huevo o embrión fertilizado en el hospedador, y obtener una camada que comprende un animal hembra.

En un aspecto, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se emplean para preparar una mascota hembra, un animal de granja domesticado hembra, un animal hembra como un sujeto de investigación científica, o un animal de una especie en peligro de extinción. En una realización, el animal es un ratón, rata, hámster, mono, simio, gato, perro, vaca, caballo, toro, oveja, cabra, cerdo, ciervo, y bisonte.

Ejemplos

Ejemplo 1: Células ES donantes de XY y embriones hospedadores

Células donantes y embriones hospedadores. Las células ES donantes fueron células ES híbridas 129S6C57Bl6/F1. Las células ES donantes se congelaron en medio de congelación que contenía DMSO al 10 % hasta su uso. Una vez descongeladas, las células ES donantes se mantuvieron en medio base y suplementos como se describe a continuación. Los embriones hospedadores fueron de ratones Swiss Webster (SW), y se mantuvieron en medio KSOM (Millipore) hasta su uso. Se obtuvieron embriones de ocho células como se ha descrito anteriormente (Poueymirou et al. (2007) Nature Biotech. 25 (1):91-99; Patentes de Estados Unidos números 7.659.442, 7.576.259, y 7.294.754).

Células DMEM ES: Las células ES preparadas y congeladas en DMEM se descongelaron en DMEM, se hicieron crecer durante tres días, y se microinyectaron en los embriones hospedadores en DMEM.

Células DMEM ES con una concentración baja en sal: las células ES preparadas y congeladas en DMEM con una concentración baja de sal se descongelaron en DMEM con una concentración baja de sal (KO-DMEM), se hicieron crecer durante tres días, y se microinyectaron en los embriones hospedadores en DMEM.

FS DMEM con una concentración baja de sal: Las células ES preparadas y congeladas en DMEM con una concentración baja de sal se descongelaron y mantuvieron en DMEM con una concentración baja de sal (440 ml) + 10 % de medio acondicionado con Wnt-3a (FS) (60 ml) y se microinyectaron en embriones hospedadores en DMEM.

DMEM con una concentración baja de sal + NaCl + NaHCO₃: Células ES preparadas y congeladas en DMEM con una concentración baja de sal con NaCl (1.300 mg/l) y NaHCO₃ (1.500 mg/l) y se microinyectaron en embriones hospedadores en DMEM.

10 % de medio acondicionado con Wnt-3a (FS): Se preparó medio acondicionado con Wnt-3a a partir de cultivos de células L de ratón a partir de cultivos con un vector de expresión Wnt-3a (ATCC CRL-2647). Las células L se hicieron crecer de acuerdo con instrucciones de la ATCC (excepto que se usó KO-DMEM™ en lugar de DMEM), en un sistema FibraStage™ (New Brunswick).

Ejemplo 2: Preparación de la generación F0 de ratones derivados de células ES donantes

Generar la generación F0 de ratones. Las células ES donantes se introdujeron en embriones hospedadores premórula en la etapa de 8 células usando el método VELOCIMOUSE®, como se ha descrito anteriormente (Poueymirou et al. (2007) Nature Biotech. 25 (1):91-99; Patentes de Estados Unidos números 7.659.442, 7.576.259, y 7.294.754), excepto que las células ES de ratón se mantuvieron en el medio base más suplementos como se describe en el presente documento. Para la microinyección, se hicieron crecer células ES y se microinyectaron en los embriones, y los embriones se cultivaron durante la noche tanto en medio KSOM como DMEM antes del implante en madres surrogadas.

Ejemplo 3: Ratones hembra fértiles de generación F0 procedentes de células ES de donantes XY

En un protocolo típico, Se descongelaron células ES en presencia de KO-DMEM™ y se hicieron crecer durante un pase (aproximadamente cinco (5) días). Las células pasadas se electroporaron a continuación con un vector dirigido a un gen y a continuación se colocaron bajo selección durante 10 días en un medio que comprendía KO-DMEM™ (Invitrogen n.º de Cat. 10829-018). Se recogieron las células resistentes a fármacos y se expandieron en un medio que comprendía KO-DMEM™, a continuación se congelaron. Para la microinyección, se descongelaron las células en KO-DMEM™ y se hicieron crecer durante 3 días en KO-DMEM™, a continuación se microinyectaron en embriones en DMEM. A continuación se introdujeron los embriones en madres surrogadas para la gestación.

Las crías de ratón se caracterizaron inicialmente como machos o hembras basándose en la apariencia de los genitales externos a fin de seleccionar las parejas reproductoras.

La FIG. 1 muestra que las hembras XY F0 presentan un alto índice de fertilidad. Veintiuna de 33 hembras XY F0 produjeron camadas.

Ejemplo 4: Comparación de DMEM con DMEM con una concentración baja de sal

Se midió la osmolalidad en un osmómetro de muestra única modelo 3250 Advanced®. Se midió la conductividad en un conductivímetro ECN n.º 15055 Mettler Toledo GmbH SevenMulti™.

Se estudió el efecto de DMEM con una concentración baja de sal y de DMEM (cada uno con suplementos) sobre la formación de las células ES XY procedentes de las hembras XY de generación F0. La Tabla 2 muestra los valores de osmolalidad y conductividad de los medios base con y sin sales adicionales y/o suplementos. El indicador "+ suplementos" = adición (a 0,5 l de medio base) de los siguientes: 90 ml Hyclone FBS (n.º de Cat. SH30070.03), 12 ml de solución de glutamina de Invitrogen (n.º de Cat. 25030-081), 6 ml de Invitrogen Pen Strep (n.º de Cat. 15140-122), 6 ml de piruvato de sodio de Invitrogen (n.º de Cat. 11360-070), 6 ml de MEM NEAA (Invitrogen n.º de Cat. 11140-050), 1,2 ml de 2-mercaptoetanol, y 120 microlitros de Millipore ESGRO™-LIF (n.º de Cat. ESG1107).

La FIG. 2 muestra una comparación de las células ES XY que crecen en diferentes medios antes de las microinyecciones en embriones hospedadores. Las células ES XY crecen y se mantienen en DMEM con una concentración baja de sal y a continuación se inyectaron en embriones que produjeron hembras XY. Las células ES XY crecen y se mantienen en DMEM con una concentración baja de sal suplementado con NaCl y NaHCO₃ y a continuación se inyectaron en embriones que no produjeron hembras XY. Esto demuestra que la producción de hembras XY se promueve cuando las células ES XY se mantienen en DMEM con una concentración baja de sal, y en el que la relación de sexos de las células ES XY puede controlarse alterando la concentración de sal del medio base. Añadir un medio acondicionado con Wnt-3a (10 % de FS) a un DMEM con una concentración baja de sal aumentó la frecuencia de producción de hembras XY F0.

Además, la eficacia de generar ratones derivados de células ES en la F0 aumentó cuando las células ES se mantuvieron con DMEM con una concentración baja de sal. La relación de crías derivadas de células ES a crías totales generadas en la generación F0 aumentó desde aproximadamente 23 % para células ES mantenidas en DMEM, a 61 % para células ES mantenidas en DMEM con una concentración baja de sal, a 72 % para células ERS mantenidas en DMEM con una concentración baja de sal suplementadas con 10 % de medio acondicionado con Wnt-3a. Véase la figura 2.

Tabla 2: Comparación de DMEM y características físicas de DMEM con una concentración baja de sal		
Medio para células ES	Conductividad (mS/cm)	Osmolalidad (mOsm/l)
DMEM con una concentración baja de sal, solo	12,84	270
DMEM, solo	15,40	337
DMEM con una concentración baja de sal + NaHCO ₃ + NaCl, solo	15,82	342
DMEM con una concentración baja de sal, + suplementos	12,75	279
DMEM, + suplementos	14,91	330
DMEM con una concentración baja de sal + NaHCO ₃ + NaCl, + suplementos	15,29	335

Ejemplo 5: Análisis de ratones de generación F0

Color del pelaje. Se analizaron los ratones para la contribución del color del pelaje de las células ES de donante de XY (agutí) y el embrión hospedador (blanco). Ninguno de los ratones de la generación F0 presentó ninguna contribución al color del pelaje a partir de los embriones hospedadores.

Género. Se identificaron las crías de la generación F0 como hembras o machos mediante inspección visual de los genitales externos. Se asignaron los géneros de las crías F0 y se emparejaron para la reproducción basándose en la inspección visual.

Genotipado. Se detectó la presencia de un cromosoma X usando un ensayo QPCR TAQMAN™ específico de una secuencia en el cromosoma X. Se detectó la presencia de del cromosoma Y usando un ensayo QPCR TAQMAN™ específico de una secuencia en el cromosoma Y. El genotipado de los ratones de generación F0 fenotípicamente hembra indicó una única copia del cromosoma X y una única copia del cromosoma Y en aquellos ratones fenotípicamente hembra ensayados.

Cariotipado. Se cariotiparon seis hembras XY de generación F0. Los resultados del cariotipado indicaron que los seis tenían un cromosoma X normal y un cromosoma Y normal.

Anatomía reproductiva de una hembra XY. Se examinaron algunas hembras XY de generación F0 para estudiar los órganos reproductores internos. Todas las hembras XY F0 parecieron tener órganos reproductores internos de hembra normales. Se genotiparon las muestras de tejido de cada órgano reproductor (ovario, oviducto, útero) y los resultados indicaron que los tejidos tenían un genotipo XY uniforme.

5

Ejemplo 6: Análisis del efecto de la osmolalidad sobre la eficacia de la generación de crías y hembras XY derivadas de células ES

- 10 Para determinar el efecto de la osmolalidad sobre la generación de hembras XY a partir de células ES XY mantenidas en DMEM con una concentración baja de carbonato y una concentración baja de sal, se añadió glucosa al DMEM con una concentración baja de carbonato y una concentración baja de sal para llevar la osmolalidad a la del DMEM. Se midió la osmolalidad en un osmómetro de muestra única modelo 3250 Advanced®.

Tabla 3: Efecto de la osmolaridad, la sal, y el carbonato sobre crías derivadas de células ES y hembras XY F0

Medios	Osmolalidad (mOsm/kg)	NaCl (mg/ml)	NaHCO ₃ (mg/ml)	Glucosa (mg/ml)	Crías derivadas de ES/Crías totales	Crías derivadas de macho XY	
						macho XY	hembra XY
DMEM	329	6,4	3,7	4,5	13/58 (22,4 %)	13/13	0/13 (0 %)
DMEM-LS/IC	270	5,1	2,2	4,5	36/71 (50,7 %)	26/36	10/36 (27,8 %)
DMEM-LS/IC/HG	322	5,1	2,2	15,5	20/50 (40 %)	17/20	3/20 (15 %)
DMEM-VLS/IC	218	3,0	2,2	4,5	53/58 (91,4 %)	35/53	18/53 (34,0 %)
DMEM-LS/VLC	261	5,1	1,5	4,5	50/57 (87,7 %)	33/50	17/50 (34 %)
DMEM-VLC	294	6,4	1,5	4,5	49/68 (72,1 %)	35/49	14/49 (28,6 %)

15

Las células ES donantes de XY se mantuvieron en DMEM con un alto contenido de glucosa, una concentración baja de carbonato y una concentración baja de sal que contenía entre otros 5,1 mg/ml de NaCl, 2,2 mg/ml de NaHCO₃, y 15,5 mg/ml de glucosa, que tiene una osmolalidad de 322 mOsm/kg ("DMEM-LS/IC/HG"). Tras la transferencia de dichas células ES en embriones por el método VELOCIMOUSE® (más arriba), 15 % de toda la descendencia F0 derivada de células ES resultantes fueron ratones XY fenotípicamente hembras. Como control negativo, en la generación de F0, no se derivaron ratones XY fenotípicamente hembras de las células ES mantenidas en DMEM ("DMEM": 6,4 mg/ml de NaCl, 3,7 mg/ml de NaHCO₃, y 4,5 mg/ml de glucosa; 329 mOsm/kg). Este resultado del 15 % de hembras XY F0 se basa en el 0 % de hembras XY F0 de células ES derivadas de DMEM (329 mOsm/l) y el 27,8 % de ratones hembra XY F0 derivado de células ES mantenidas en DMEM con una concentración baja de carbonato y una concentración baja de sal ("DMEM-LS/IC": 5,1 mg/ml de NaCl, 2,2 mg/ml de NaHCO₃, y 4,5 mg/ml de glucosa; 270 mOsm/kg). Por lo tanto, una interpretación es que la osmolalidad proporciona algo del efecto de feminización, pero no todo. Una explicación alternativa es que la concentración baja de sal y la concentración baja de carbonato proporciona el efecto de feminización, y una concentración alta de glucosa impide en alguna extensión la feminización de las células ES XY. Véase la Tabla 3.

20

25

30

Además, la eficacia de generar ratones derivados de células ES (Tabla 3) en F0 cuando las células ES se mantuvieron en DMEM-LS/IC/HG (es decir, aproximadamente 40 %) fue mayor que la de las células ES mantenidas en DMEM (es decir, aproximadamente 22 %), pero no es tan alta como la de las células ES mantenidas en DMEM-LS/IC (es decir, aproximadamente 51 %). Véase la Tabla 3.

35

Ejemplo 7: Análisis del efecto de la concentración de sal sobre la eficacia de generar crías y hembras FY derivadas de células ES

Para determinar el efecto de la concentración de sal o la fuerza iónica sobre la generación de hembras XY a partir de células ES XY, se mantuvieron células ES en una concentración de sal muy pequeña (DMEM-VLS/IC: 3,0 mg/ml de NaCl, 2,2 mg/ml de NaHCO₃, y 4,5 mg/ml de glucosa, a 218 mOsm/kg). Tras la transferencia de dichas células ES en embriones por el método VELOCIMOUSE® (más arriba), 34 % de toda la descendencia F0 derivada de células ES

40

resultantes fueron ratones XY fenotípicamente hembras; hubo un ligero aumento sobre el nivel del control DMEM-LS/IC del 27,8 %. De forma interesante, El 91,4 % de las crías F0 resultantes de la transferencia de células ES mantenidas en medio DMEM-VLS/IC fueron derivadas de células ES; mientras que solo un 50,7 % y un 22,4 % fueron derivadas de células ES en los controles de DMEM-LS/IC y DMEM, respectivamente.

En otro experimento, Las células ES se mantuvieron en un medio con una concentración alta de sal y una concentración baja de carbonato (DMEM-HS/VLC: 6,4 mg/ml de NaCl, 1,5 mg/ml de NaHCO₃, y 4,5 mg/ml de glucosa, a 294 mOsm/kg). Tras la transferencia de dichas células ES en embriones por el método VELOCIMOUSE® (más arriba), 28,6 % de toda la descendencia F0 derivada de células ES resultantes fueron ratones XY fenotípicamente hembras; hubo un ligero aumento sobre el nivel del control DMEM-LS/IC del 27,8 %. De forma interesante, el 72,1 % de las crías F0 resultantes de la transferencia de células ES mantenidas en medio DMEM-HS/VLC fueron derivadas de células ES; mientras que solo un 50,7 % y un 22,4 % fueron derivadas de células ES en los controles de DMEM-LS/IC y DMEM, respectivamente.

Estos resultados confirman que una concentración baja de sal y/o una concentración baja de carbonato contribuyen al aumento en la proporción de la descendencia F0 derivada de células ES así como de hembras XY F0. (véase la Tabla 3.)

Ejemplo 8: Análisis del efecto de la concentración de carbonato sobre la eficacia de generar crías y hembras XY derivadas de células ES

Para determinar el efecto de la concentración de carbonato sobre la generación de hembras XY a partir de células ES XY, Las células ES se mantuvieron en medio con una concentración baja de sal y una concentración muy baja de carbonato (DMEM-LS/VLC: 5,1 mg/ml de NaCl, 1,5 mg/ml de NaHCO₃, y 4,5 mg/ml de glucosa, a 261 mOsm/kg). Tras la transferencia de dichas células ES en embriones por el método VELOCIMOUSE® (más arriba), 34 % de toda la descendencia F0 derivada de células ES resultantes fueron ratones XY fenotípicamente hembras; hubo un ligero aumento sobre el nivel del control DMEM-LS/IC del 27,8 %. De forma interesante, el 87,7 % de las crías F0 resultantes de la transferencia de células ES mantenidas en medio DMEM-LS/VLC fueron derivadas de células ES; mientras que solo un 50,7 % y un 22,4 % fueron derivadas de células ES en los controles de DMEM-LS/IC y DMEM, respectivamente.

Estos resultados confirman que una concentración baja de carbonato contribuye al aumento en la proporción de la descendencia F0 derivada de células ES así como de hembras XY F0. (véase la Tabla 3.)

Ejemplo 9: Fenotipo de ratones hembra XY F0

Ratones fenotípicamente hembras XY F0 presentaron atributos de fenotipo relativamente normales en comparación con ratones fenotípicamente hembra XX F1 de la misma variedad. Los ratones hembras XY sin embargo, no presentaron un intervalo de valores más grande para cada parámetro físico. El peso corporal de las hembras XY adultas varió desde aproximadamente 15 gramos a aproximadamente 30 gramos con un promedio de aproximadamente 21,5 gramos. El peso corporal de las hembras XX adultas varió desde aproximadamente 16 gramos a aproximadamente 17 gramos con un promedio de aproximadamente 16,8 gramos.

La relación de la distancia entre el ano y los genitales se determinó y calculó como una relación de masa corporal (distancia anogenital (cm) / masa corporal (g)). La relación para las hembras XY F0 varió desde aproximadamente 0,11 cm/g a aproximadamente 0,24 cm/g con un promedio de aproximadamente 0,16 cm/g. La relación para las hembras XX F1 varió desde aproximadamente 0,17 cm/g a aproximadamente 0,19 cm/g con un promedio de aproximadamente 0,18 cm/g.

No hubo diferencia significativa entre las masas relativas de diversos órganos (por ejemplo, el hígado, riñones, corazón y pulmón, y bazo) para los ratones hembra XY y los ratones hembra XX. Las masas relativas se expresan como masa de órgano (mg) / masa corporal (g). La masa relativa del hígado de las hembras XO F0 variaron desde aproximadamente 35 mg/g a aproximadamente 50 mg/g con un promedio de aproximadamente 42 mg/g. La masa relativa del hígado de las hembras XX F1 varió desde aproximadamente 37,5 mg/g a aproximadamente 46,9 mg/g con un promedio de aproximadamente 42,5 mg/g. La masa relativa de los riñones de las hembras XO F0 varió desde aproximadamente 11,5 mg/g a aproximadamente 15 mg/g con un promedio de aproximadamente 13,4 mg/g. La masa relativa de los riñones de las hembras XX F1 varió desde aproximadamente 12,6 mg/g a aproximadamente 13,8 mg/g con un promedio de aproximadamente 13,7 mg/g. La masa combinada relativa del corazón y los pulmones de las hembras XO F0 varió desde aproximadamente 14,3 mg/g a aproximadamente 18,9 mg/g con un promedio de aproximadamente 16,1 mg/g. La masa combinada relativa del corazón y los pulmones de las hembras XX F1 varió desde aproximadamente 14,7 mg/g a aproximadamente 16,1 mg/g con un promedio de aproximadamente 15,9 mg/g. La masa relativa del bazo de las hembras XO F0 varió desde aproximadamente 2,7 mg/g a aproximadamente 6,6 mg/g con un promedio de aproximadamente 3,3 mg/g. La masa relativa del bazo de las hembras XX F1 varió desde aproximadamente 2,7 mg/g a aproximadamente 4,0 mg/g con un promedio de aproximadamente 3,8 mg/g.

Los ratones hembra XY F0 se mostró que tenían niveles séricos de electrolitos relativamente normales, enzimas, glucosa, proteínas, lípidos y otros indicios en comparación con las hembras XX F1 singénicas. Los ratones hembra

XY no presentan sin embargo un intervalo más grande de valores de cada parámetro sérico medido. Los niveles de sodio en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 150 mEq/l a aproximadamente 159 mEq/l; y los niveles para las hembras XX variaron de aproximadamente 148 mEq/l a aproximadamente 155 mEq/l.

- 5 Los niveles de potasio en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 0,7 mEq/l a aproximadamente 7 mEq/l; Y los niveles para las hembras XX fueron aproximadamente de 0,7 mEq/l.

- 10 Los niveles de cloruro en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 111 mEq/l a aproximadamente 121 mEq/l; y los niveles para las hembras XX variaron de aproximadamente 113 mEq/l a aproximadamente 120 mEq/l.

Los niveles de calcio en suero de las hembras de XY adultas variaron desde aproximadamente 7 mEq/l a aproximadamente 9 mEq/l; Y los niveles para las hembras XX fueron aproximadamente de 7 mEq/l.

- 15 Los niveles de la fosfatasa alcalina en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 124 U/l a aproximadamente 285 U/l; y los niveles para las hembras XX variaron desde aproximadamente 191 U/l a aproximadamente 236 U/l.

- 20 Los niveles de alanina aminotransferasa de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 21 U/l a aproximadamente 285 U/l; y los niveles para las hembras XX variaron desde aproximadamente 13 U/l a aproximadamente 34 U/l.

- 25 Los niveles de la aspartato aminotransferasa en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 42 U/l a aproximadamente 190 U/l; y los niveles para las hembras XX variaron desde aproximadamente 42 U/l a aproximadamente 269 U/l.

- 30 Los niveles de la lipasa en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 16 U/l a aproximadamente 49 U/l; y los niveles para las hembras XX variaron desde aproximadamente 21 U/l a aproximadamente 26 U/l.

- Los niveles de glucosa en suero de las hembras XY adultas varió desde aproximadamente 227 mg/dl a aproximadamente 319 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde a aproximadamente 255 mg/dl a aproximadamente 270 mg/dl.

- 35 Los niveles totales de proteína en suero variaron desde aproximadamente 4,6 mg/dl a aproximadamente 5,2 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde a aproximadamente 4,6 mg/dl a aproximadamente 4,8 mg/dl.

- 40 Los niveles de albúmina en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 3 mg/dl a aproximadamente 3,5 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde a aproximadamente 3,1 mg/dl a aproximadamente 3,2 mg/dl.

- 45 Los niveles de colesterol en suero (total) de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 58 mg/dl a aproximadamente 108 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde a aproximadamente 61 mg/dl a aproximadamente 85 mg/dl.

- Los niveles de triglicéridos en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 42 mg/dl a aproximadamente 89 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde a aproximadamente 39 mg/dl a aproximadamente 48 mg/dl.

- 50 Los niveles de HDL en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 29 mg/dl a aproximadamente 57 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde a aproximadamente 23 mg/dl a aproximadamente 42 mg/dl.

- 55 Los niveles de LDL en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 3,7 mg/dl a aproximadamente 11 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde a aproximadamente 3,7 mg/dl a aproximadamente 13 mg/dl.

- 60 Los niveles de colesterol en suero (BUN) de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 12 mg/dl a aproximadamente 27 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde a aproximadamente 18 mg/dl a aproximadamente 21 mg/dl.

Los niveles de magnesio en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 1,6 mg/dl a aproximadamente 3,2 mg/dl; y los niveles para las hembras XX fueron aproximadamente de 2,1 mg/dl.

- 65 Los niveles de fosfato inorgánico en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 5,1 mg/dl a aproximadamente 10 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde aproximadamente 7,2 mg/dl a

aproximadamente 8,4 mg/dl.

Los niveles de ácido úrico en suero de las hembras XY adultas variaron desde aproximadamente 0,9 mg/dl a aproximadamente 3,5 mg/dl; y los niveles para las hembras XX variaron desde aproximadamente 0,7 mg/dl a aproximadamente 2,2 mg/dl.

Ejemplo 10: Producción de ratón homocigótico genéticamente modificado en la generación F1

Para determinar si podrían prepararse ratones F1 homocigóticos para una modificación genética, Se emparejaron ratones hembra XY F0 que contenían al menos un alelo inactivado génicamente de un gen STEAP2 para la cohorte XY que contenían el mismo gen STEAP2 inactivado génicamente. (El gen STEAP2 (antígeno seis transmembrana epitelial de la próstata 2) codifica una presunta metalorreductasa de 6 membrana con ferrireductasa y actividad de reductasa cúprica, y se ha mostrado que estimula la captación celular del hierro y cobre *in vitro*. Como antígeno de la superficie celular, STEAP2 es un diagnóstico potencial o una diana terapéutica en el cáncer de próstata. STEAP2 se elevó significativamente en carcinomas de próstata primarios sin tratar y en carcinomas de próstata refractarios a hormonas que en las hiperplasias benignas de próstata, sugiriendo que puede estar implicado en el desarrollo del cáncer de próstata. No se ha notificado STEAP2 KO de ratón. Véase Ohgami et al., BLOOD, vol. 108(4):1388-1394, 2006.) Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Genotipos de cohortes STEAP2 F1 procedentes de machos XY F0 x hembras XY F0				
Fenotipo del sexo	Cromosomas sexuales (N/%)	Genotipo de STEAP2 (N/%)		
		Wt/wt	Wt/KO	KO/KO
Mujer	XX (7/15 %)	2 /4,3 %	3/6,4 %	2 /4,3 %
	XO (4/8,5 %)	1 /2,1 %	1 /2,1 %	2 /4,3 %
	XY (0 /0 %)	0 /0 %	0 /0 %	0 /0 %
Hombre	XY (17/36 %)	6/12,8 %	6/12,8 %	5/10,6 %
	XXY (8/17 %)	3 /6,4 %	3/6,4 %	2 /4,3 %
	XYY (11 /23,5 %)	3 /6,4 %	3/6,4 %	5/10,6 %

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un ratón XY fenotípicamente hembra fértil en una generación F0, que comprende:

5 (a) mantener una célula ES de ratón XY donante en un medio que comprende

- (i) un medio base que presenta una osmolalidad de no más de 322 mOsm/kg, y
- (ii) suplementos adecuados para mantener las células ES de ratón en cultivo;

10 (b) introducir la célula ES de ratón XY donante de la etapa (a) en un embrión de ratón hospedador en la etapa de premórula;

(c) gestar el embrión hospedador; y

(d) obtener una descendencia de ratón en la generación F0 que comprende un ratón XY fenotípicamente hembra F0, en el que, al alcanzar la madurez sexual, el ratón XY fenotípicamente hembra F0 es fértil.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el medio base presenta además una característica seleccionada entre el grupo que consiste en: una conductividad de aproximadamente 11-13 mS/cm, una sal de un metal alcalino y un haluro en una concentración de aproximadamente 50-110 mM, una concentración de sal de ácido carbónico de aproximadamente 17-30 mM, una concentración total de sal de haluro de metal alcalino y una concentración de sal de ácido carbónico de aproximadamente 85-130 mM.

20 3. Un método para aumentar la eficacia de generar ratones derivados de embriocitoblastos (ES) en una generación F0, que comprende:

25 (a) mantener una célula ES de ratón XY donante en un medio que comprende:

(i) un medio base; y

(ii) suplementos adecuados para hacer crecer las células ES de ratón en cultivo, en el que el medio base comprende bicarbonato de sodio en una concentración de 1,5-2,2 mg/ml, y tiene una osmolalidad de 218-322 mOsm/kg;

(b) introducir la célula ES de ratón XY donante de la etapa (a) en un embrión de ratón hospedador en la etapa de premórula;

(c) gestar el embrión hospedador de ratón; y

35 (d) obtener la descendencia de ratón XY F0, en el que la relación de crías derivadas de células ES a crías totales generadas en la generación F0 es mayor que la relación de crías derivadas de células ES a crías totales generadas en la generación F0 producidas a partir de células ES XY donantes mantenidas en un medio que tiene una osmolalidad de más de 322 mOsm/kg.

40 4. El método de la reivindicación 1 o 3, en el que la célula ES de ratón XY donante comprende una modificación genética, opcionalmente en el que la modificación genética comprende una o más de una delección en toda o en parte de una secuencia de ácido nucleico endógeno, una sustitución de uno o más ácidos nucleicos, una sustitución de una secuencia de ácido nucleico endógeno con una secuencia de ácido nucleico heterólogo, una inactivación génica y una inserción de una secuencia específica, opcionalmente en el que la inactivación génica es una inactivación génica de un gen STEAP2, opcionalmente en el que la célula ES de ratón XY donante es heterocigótica para la modificación genética.

50 5. El método de la reivindicación 1, en el que la célula ES de ratón XY donante no comprende una modificación genética de una Tdy-inversión negativa de sexo.

6. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el medio base:

(a) presenta una osmolalidad de 218-322 mOsm/kg o una osmolalidad de no más de 320 mOsm/kg;

(b) comprende cloruro de sodio;

55 (c) comprende bicarbonato de sodio; y/o

(d) comprende glucosa, opcionalmente, en una concentración de aproximadamente 4,5 mg/ml.

60 7. El método de la reivindicación 1 o 3, en el que el medio base comprende bicarbonato de sodio en una concentración de 1,5-2,2 mg/ml, cloruro de sodio en una concentración de 3,0-6,4 mg/ml y presenta una osmolalidad de 218-322 mOsm/kg

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o 4-5, en el que el medio base presenta:

(a) 50 ± 5 mM de NaCl, 26 ± 5 mM de carbonato, y 218 ± 22 mOsm/kg;

65 (b) 87 ± 5 mM de NaCl, 18 ± 5 mM de carbonato, y 261 ± 26 mOsm/kg;

(c) 110 ± 5 mM de NaCl, 18 ± 5 mM de carbonato, y 294 ± 29 mOsm/kg; o

(d) 87 ± 5 mM de NaCl, 26 ± 5 mM de carbonato, y 270 ± 27 mOsm/kg.

- 5 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 u 8(a), en el que el medio base presenta aproximadamente 3 mg/ml de NaCl, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sodio, y 218 mOsm/kg, opcionalmente 4,5 mg/ml de glucosa.
- 10 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 u 8(b), en el que el medio base presenta aproximadamente 5,1 mg/ml de NaCl, 1,5 mg/ml de bicarbonato de sodio, y 261 mOsm/kg.
- 10 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 u 8(c), en el que el medio base presenta aproximadamente 6,4 mg/ml de NaCl, 1,5 mg/ml de bicarbonato de sodio, y 294 mOsm/kg.
- 15 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 u 8(d), en el que el medio base presenta aproximadamente 5,1 mg/ml de NaCl, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sodio, y 270 mOsm/kg.
- 20 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el medio base presenta aproximadamente 5,1 mg/ml de NaCl, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sodio, 15,5 mg/ml de glucosa, y 322 mOsm/kg.
14. El método de la reivindicación 3, que comprende además modificar genéticamente la célula ES de ratón XY donante.
15. El método de la reivindicación 3, en el que la relación de crías derivadas de células ES a crías totales generadas en la generación F0 es mayor del 23 %, opcionalmente al menos el 40 %, al menos el 51 %, al menos el 61 %, al menos el 72 %, al menos el 87 % o al menos el 91 %.
- 25 16. El método de la reivindicación 3, en el que el medio base comprende además suero de feto de bovino y/o medio acondicionado con Wnt-3a.

Análisis de fertilidad de ratones fenotípicamente hembra de la generación F0 derivados de clones de células ES XY							
Clon	Genotipo	F0 configurado para reproducción (n.º)	F0 con camadas (n.º)	F0 con camadas (%)	Camadas (n.º)	Total Crías (n.º)	Crías por camada (n.º)
860a-H1	XY	2	1	50	3	11	3,7
829a-E2	XY	1	0	0	0	0	—
5339a-A5	XY	2	2	100	8	55	6,9
5315a-D1	XY	1	1	100	8	48	6
5311b-D1	XY	4	1	25	4	37	9,3
5310a-D4	XY	1	1	100	6	32	5,3
5310a-B1	XY	6	6	100	34	188	5,5
5310a-A5	XY	2	2	100	11	75	6,8
5137b-E1	XY	2	2	100	12	74	6,2
294d-A5	XY	1	0	0	0	0	—
1553a-A10	XY	2	0	0	0	0	—
1533b-A2	XY	2		50	2	16	8
13304a-D5	XY	1		100	2	15	7,5
1313h-F3	XY	2		50	1	2	2
12221b-B3	XY	1		100	1	10	10
11465d-G1	XY	1		100	6	49	8,2
884a-D1	XY	2	0	0	0	0	—
Sumario		33 (Σ)	21 (Σ)	63 %	98 (Σ)	592 (Σ)	6 (prom)

FIG. 1

Efecto de DMEM y DMEM bajo en sales sobre la formación de hembras XY en la generación F0 a partir de células ES XY									
Clon ES	Medio		Embriones transferidos (n.º)	Crías nacidas (n.º)	Machos VM (n.º)	Hembras VM (n.º)	Genotipado XY		
	Producción y descongelación del clon								
1	d-G4	DMEM bajo en sales	50	19	8	4	todas las hembras son XY		
2	d-A1	DMEM bajo en sales	50	5	0	0	todas las hembras son XY		
3	e-C2	DMEM bajo en sales	50	4	3	1	todas las hembras son XY		
4	e-D1	DMEM bajo en sales	50	22	12	2	todas las hembras son XY		
5	e-H2	DMEM bajo en sales	50	14	10	0	—		
6	e-H3	DMEM bajo en sales	50	11	6	0	—		
			Totales	300	39	7	todas las hembras son XY		
8	d-C6	DMEM bajo en sales + FS al 10%	50	14	2	5	todas las hembras son XY		
9	d-A5	DMEM bajo en sales + FS al 10%	50	26	7	7	todas las hembras son XY		
10	e-B6	DMEM bajo en sales + FS al 10%	50	18	8	5	todas las hembras son XY		
11	e-A5	DMEM bajo en sales + FS al 10%	50	18	13	3	todas las hembras son XY		
12	e-C6	DMEM bajo en sales + FS al 10%	50	19	11	3	—		
13	e-F5	DMEM bajo en sales + FS al 10%	50	19	13	5	—		
			Totales	300	54	28	todas las hembras son XY		
15	d-H9	DMEM bajo en sales +NaCl+NaHCO ₃	50	30	9	0	—		
16	d-C10	DMEM bajo en sales +NaCl+NaHCO ₃	50	14	4	0	—		
17	e-A9	DMEM bajo en sales +NaCl+NaHCO ₃	50	3	0	0	—		
18	e-G8	DMEM bajo en sales +NaCl+NaHCO ₃	50	22	3	0	—		
19	e-H9	DMEM bajo en sales +NaCl+NaHCO ₃	50	2	0	0	—		
			Totales	250	16	0	—		

FIG. 2