



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 731**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01) **C07K 14/465** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01) **C12N 15/63** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01928006 .4**

96 Fecha de presentación : **19.04.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1280898**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.02.2003**

54

Título: **Células ES modificadas y gen específico de células ES.**

30

Prioridad: **11.05.2000 FR 00 06029**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.05.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.05.2011**

73

Titular/es:  
**Institut National de la Recherche Agronomique**  
**147, rue de l'Université**  
**75007 Paris, FR**  
**Centre National de la Recherche Scientifique**  
**(CNRS) y**  
**Ecole Normale Supérieure de Lyon**

72

Inventor/es: **Acloque, Hervé;**  
**Biot, Anne-Marie;**  
**Risson, Valérie;**  
**Pain, Bertrand y**  
**Samarut, Jacques**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 358 731 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

5 La presente invención se refiere a unas células ES de pájaro modificadas, que expresan específicamente un gen exógeno cuando poseen un carácter pluripotente. La invención se refiere asimismo a un ácido nucleico y a un polipéptido expresados específicamente en las células de pájaro pluripotentes, así como a unos métodos de detección del carácter pluripotente de células que utilizan este ácido nucleico y este polipéptido.

10 Las células ES son unas células pluripotentes aisladas de embrión muy precoz, que son capaces de participar en la morfogénesis de todos los tejidos incluyendo el tejido germinal, después de su trasplante en unos embriones hospedantes. Estas células han sido en primer lugar aisladas en el ratón en el que se utilizan muy ampliamente para la creación de animales mutantes que llevan unas modificaciones muy determinadas de su genoma. Unas células ES han sido aisladas y caracterizadas en los pájaros (Pain *et al.*, 1996). Estas células pueden ser utilizadas para modificar el patrimonio genético del pollo (Etches *et al.*, Pain *et al.*, 1999). Un medio de cultivo que permite mantener el carácter pluripotente de estas células de pájaros ha constituido el objeto de la solicitud de patente WO 96/12793.

15 La dificultad encontrada por todos los que desean aislar unas células ES en cultivo se refiere a la identificación rápida de estas células y de su carácter pluripotente. Se han utilizado varios marcadores celulares tales como la expresión de una actividad fosfatasa alcalina (Strickland *et al.*, 1980), la expresión de epítomos antigénicos (Kemler *et al.*, 1981, Solter y Knowles 1978), la expresión de proteínas específicas tales como OCT-3 (Rosner *et al.*, 1990), la expresión de una actividad telomerasa (Prowse y Greider 1995). Las proteínas OCT-3, REX-1, UTF-1 entre otras han sido identificadas hasta ahora sólo en el ratón. La verificación última del carácter pluripotente se basa en el análisis de las potencialidades morfogenéticas de estas células después de su injerto en unos embriones hospedantes, lo cual representa un ensayo muy pesado.

20 Otra dificultad encontrada con el cultivo de las células ES en cultivo comprende la obtención de poblaciones celulares de un grado de heterogeneidad baja y satisfactoria, y el problema del control del crecimiento en cultivo de células no-pluripotentes. En efecto, un problema particular está asociado a la presencia continua de ciertos tipos celulares diferenciados, es decir que estas células son capaces de eliminar las células ES del cultivo induciendo su diferenciación o su muerte celular programada.

25 La presente invención propone simplificar la identificación del carácter pluripotente de células de pájaros en cultivo, mediante la divulgación de una secuencia nucleica (gen *ens-1*) expresada específicamente y selectivamente por las células pluripotentes.

30 Así, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico caracterizado porque comprende una secuencia nucleica seleccionada de entre el grupo de secuencias siguientes:

- a) SEC ID nº 1, o el fragmento nucleotídico 1409-2878 de SEC ID nº 1;
- b) el fragmento nucleotídico 3111-3670 de SEC ID nº 1;
- 35 c) una secuencia nucleica que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, después de la alineación óptima con una secuencia definida en a) o en b), que desempeña una función en el carácter de pluripotencia de las células ES y que se puede utilizar como marcador del carácter de pluripotencia de las células ES;
- d) la secuencia complementaria o la secuencia de ARN procedente de la secuencia tal como se define en a), b) o c).

40 Preferentemente, la base presente en 2773 de SEC ID nº 1 es una "t", codificando el codón correspondiente entonces para una treonina.

La secuencia de ácidos nucleicos según la invención definida en c) presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 80% después de la alineación óptima con una secuencia tal como se define en a) o en b) anteriormente, preferentemente 90%, de manera más preferida 98%. Preferentemente, la secuencia definida en c) o en d) se compara con una de las secuencias definidas en a).

45 Por ácido nucleico, secuencia nucleica o de ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, secuencia de polinucleótido, secuencia nucleotídica, términos que se utilizarán indiferentemente en la presente descripción, se entiende designar una cadena precisa de nucleótidos, modificados o no, que permiten definir un fragmento o una región de un ácido nucleico, que comprende o no unos nucleótidos no naturales, y que puede corresponder tanto a un ADN bicatenario, un ADN monocatenario como a unos productos de transcripción de dichos ADN. Así, las secuencias nucleicas según la invención engloban asimismo los PNA (Peptid Nucleic Acid), o análogos.

50 Se debe entender que la presente invención no se refiere a las secuencias nucleotídicas en su entorno cromosómico natural, es decir en el estado natural. Se trata de secuencias que han sido aisladas y/o purificadas, es decir que han sido extraídas directa o indirectamente, por ejemplo mediante copia, habiendo sido su entorno parcialmente modificado. Se entiende así designar asimismo los ácidos nucleicos obtenidos por síntesis química.

55 Mediante la expresión "porcentaje de identidad" entre dos secuencias nucleicas o de aminoácidos en el sentido de la presente invención, se entiende designar un porcentaje de nucleótidos o de residuos de aminoácidos idénticos

entre las dos secuencias a comparar, obtenido después de la mejor alineación, siendo este porcentaje puramente estadístico y siendo las diferencias entre las dos secuencias repartidas al azar y sobre toda su longitud. Se entiende designar por "mejor alineación" o "alineación óptima" la alineación para la cual el porcentaje de identidad determinado como anteriormente es el más elevado. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se realizan tradicionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, siendo dicha comparación realizada por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970), por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988), por medio de programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Con el fin de obtener la alineación óptima, se utiliza preferentemente el programa BLAST, con la matriz BLOSUM 62. Se pueden utilizar asimismo las matrices PAM o PAM250.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima, pudiendo comprender la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos a comparar unas adiciones o unas deleciones con respecto a la secuencia de referencia para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las cuales el nucleótido o el residuo de aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Por secuencias nucleicas que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferentemente 90%, de manera más preferida 98%, después de la alineación óptima con una secuencia de referencia, se entiende designar las secuencias nucleicas que presentan, con respecto a la secuencia nucleica de referencia, ciertas modificaciones tales como, en particular, una deleción, un truncamiento, un alargamiento, una fusión química y/o una sustitución, en particular puntual, y cuya secuencia nucleica presenta por lo menos 80, preferentemente 90%, de manera más preferida 98%, de identidad después de la alineación óptima con la secuencia nucleica de referencia. Se trata preferentemente de secuencias cuyas secuencias complementarias son susceptibles de hibridarse específicamente con la secuencia SEC ID n° 1 de la invención. Preferentemente, las condiciones de hibridación específicas o de fuerte astringencia serán tales que aseguran por lo menos 80%, preferentemente 90%, de manera más preferida 98% de identidad después de la alineación óptima entre una de las dos secuencias y la secuencia complementaria de la otra.

Una hibridación en unas condiciones de fuerte astringencia significa que las condiciones de temperatura y de fuerza iónica se seleccionan de tal manera que permiten el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementarios. A título ilustrativo, unas condiciones de fuerte astringencia de la etapa de hibridación con el fin de definir los fragmentos polinucleotídicos descritos anteriormente son ventajosamente los siguientes.

La hibridación ADN-ADN o ADN-ARN se realiza en dos etapas: (1) pre-hibridación a 42°C durante 3 horas en tampón fosfato (20 mM, pH 7,5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC corresponde a una disolución de 0,15 M de NaCl + 0,015 M de citrato de sodio), 50% de formamida, 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 10 x Denhardt, 5% de sulfato de dextrano y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación propiamente dicha durante 20 horas a una temperatura que depende del tamaño de la sonda (es decir: 42°C para una sonda de tamaño > 100 nucleótidos) seguida de 2 lavados de 20 minutos a 20°C en 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavado de 20 minutos a 20°C en 0,1 X SSC + 0,1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0,1 x SSC + 0,1% de SDS durante 30 minutos a 60°C para una sonda de tamaño > 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridación de fuerte astringencia descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido pueden ser adaptadas por el experto en la materia para unos oligonucleótidos de tamaño más grande o más pequeño, según la enseñanza de Sambrook *et al.*, 1989.

Entre las secuencias nucleicas que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferentemente 90%, de manera más preferida 98%, después de la alineación óptima con la secuencia según la invención, se prefieren asimismo las secuencias nucleicas variantes de SEC ID n° 1, o de sus fragmentos, es decir el conjunto de las secuencias nucleicas que corresponden a unas variantes alélicas, es decir unas variaciones individuales de la secuencia SEC ID n° 1. Estas secuencias mutadas naturales corresponden a unos polimorfismos presentes en los pájaros, en particular en las galliformes. Preferentemente, la presente invención se refiere a las secuencias nucleicas variantes en las que las mutaciones conducen a una modificación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido, o de sus fragmentos, codificados por la secuencia normal de SEC ID n° 1.

Se entiende asimismo designar por secuencia nucleica variante cualquier ARN o ADNc que resulta de una mutación y/o de una variación de un sitio de corte y empalme de la secuencia nucleica genómica cuyo ADNc tiene por secuencia SEC ID n° 1.

La invención se refiere preferentemente a un ácido nucleico purificado o aislado según la presente invención, caracterizado porque comprende o está constituido por la secuencia SEC ID n° 1, de su secuencia complementaria o de la secuencia del ARN que corresponde a SEC ID n° 1.

Los cebadores o sondas, caracterizados porque comprenden una secuencia de un ácido nucleico según la invención, forman parte asimismo de la invención.

Así, la presente invención se refiere asimismo a los cebadores o a las sondas según la invención que pueden

permitir en particular demostrar o discriminar las secuencias nucleicas variantes, o identificar la secuencia genómica del gen cuyo ADNc está representado por SEC ID nº 1, utilizando en particular un método de amplificación tal como el método PCR, o un método similar.

5 La invención se refiere asimismo a la utilización de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre una secuencia de ácido nucleico según la invención, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias, como sonda o cebador, para la detección, la identificación, la dosificación y/o la amplificación de secuencias de ácido nucleico según la invención.

10 La invención se refiere asimismo a la utilización de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre una secuencia de ácido nucleico según la invención, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias, como oligonucleótidos sentido o antisentido específico de una secuencia de ácido nucleico según la invención.

15 Según la invención, los polinucleótidos que se pueden utilizar como sonda o como cebador en unos procedimientos de detección, de identificación, de dosificación o de amplificación de secuencia nucleica, presentan un tamaño mínimo de 15 bases, preferentemente de 20 bases, o mejor de 25 a 30 bases.

Las sondas y los cebadores según la invención pueden ser marcados directa o indirectamente por un compuesto radioactivo o no radioactivo mediante unos métodos bien conocidos por el experto en la materia, con el fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

20 Las secuencias de polinucleótidos según la invención no marcadas pueden ser utilizadas directamente como sonda o cebador.

Las secuencias son generalmente marcadas para obtener unas secuencias que se pueden utilizar para numerosas aplicaciones. El marcado de los cebadores o de las sondas según la invención se realiza mediante unos elementos radioactivos o mediante unas moléculas no radioactivas.

25 Entre los isótopos radioactivos utilizados, se pueden citar el  $^{32}\text{P}$ , el  $^{33}\text{P}$ , el  $^{35}\text{S}$ , el  $^3\text{H}$  o el  $^{125}\text{I}$ . Las entidades no radioactivas se seleccionan de entre los ligandos tales como la biotina, la avidina, la estreptavidina, la dioxigenina, los haptenos, los colorantes, los agentes luminiscentes tales como los agentes radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluorescentes, y fosforescentes.

30 Los polinucleótidos según la invención pueden así ser utilizados como cebador y/o sonda en unos procedimientos que utilizan en particular la técnica de PCR (amplificación en cadena por polimerasa) (Rolfs *et al.*, 1991). Esta técnica necesita la selección de pares de cebadores oligonucleotídicos que enmarcan el fragmento que debe ser amplificado. Se puede, por ejemplo, hacer referencia a la técnica descrita en la patente americana US nº 4.683.202. Los fragmentos amplificados pueden ser identificados, por ejemplo, después de una electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, o después de una técnica cromatográfica tal como la filtración sobre gel o la cromatografía intercambiadora de iones, y después secuenciados. La especificidad de la amplificación puede ser controlada utilizando como cebadores las secuencias nucleotídicas de polinucleótidos de la invención y como matrices unos plásmidos que contienen estas secuencias o también los productos de amplificación derivados. Los fragmentos nucleotídicos amplificados pueden ser utilizados como agentes reactivos en unas reacciones de hibridación con el fin de demostrar la presencia, en una muestra biológica, de un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a la de dichos fragmentos nucleotídicos amplificados.

La invención se refiere asimismo a los ácidos nucleicos susceptibles de ser obtenidos mediante amplificación con la ayuda de cebadores según la invención.

45 Otras técnicas de amplificación del ácido nucleico diana se pueden utilizar ventajosamente como alternativa a la PCR (PCR-like) con la ayuda de pares de cebadores de secuencias nucleotídicas según la invención. Por el término "PCR-like" se entiende designar cualquier método que utiliza unas reproducciones directas o indirectas de las secuencias de ácidos nucleicos, o bien en las que los sistemas de marcado han sido amplificados, siendo estas técnicas por supuesto conocidas. Generalmente, se trata de la amplificación del ADN mediante una polimerasa; cuando la muestra de origen es un ARN conviene efectuar previamente una transcripción inversa. Existen actualmente numerosos procedimientos que permiten esta amplificación, tal como por ejemplo la técnica SDA (Strand Displacement Amplification) o técnica de amplificación con desplazamiento de hebra (Walker *et al.*, 1992), la técnica TAS (Transcription-based Amplification System) descrita por Kwoh *et al.* (1989), la técnica 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) descrita por Guatelli *et al.* (1990), la técnica NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) descrita por Kievitis *et al.* (1991), la técnica TMA (Transcription Mediated Amplification), la técnica LCR (Ligase Chain Reaction) descrita por Landegren *et al.* (1988), la técnica de RCR (Repair Chain Reaction) descrita por Segev (1992), la técnica CPR (Cycling Probe Reaction) descrita por Duck *et al.* (1990), la técnica de amplificación con Q-beta-replicasa descrita por Miele *et al.* (1983). Algunas de estas técnicas han sido desde entonces perfeccionadas.

En el caso en el que el polinucleótido diana a detectar es un ARNm, se utiliza ventajosamente, previamente a la realización de una reacción de amplificación con la ayuda de los cebadores según la invención o a la realización de un procedimiento de detección con la ayuda de las sondas de la invención, una enzima de tipo transcriptasa inversa con el

fin de obtener un ADNc a partir del ARNm contenido en la muestra biológica. El ADNc obtenido servirá entonces de diana para los cebadores o las sondas utilizadas en el procedimiento de amplificación o de detección según la invención.

5 La técnica de hibridación de sondas se puede realizar de diversas maneras (Matthews *et al.*, 1988). El método más general consiste en inmovilizar el ácido nucleico extraído de las células de diferentes tejidos o de células en cultivo sobre un soporte (tales como la nitrocelulosa, el nylon, el poliestireno) y en incubar, en unas condiciones bien definidas, el ácido nucleico diana inmovilizado con la sonda. Después de la hibridación, el exceso de sonda se elimina y las moléculas híbridas formadas son detectadas por el método apropiado (medición de la radioactividad, de la fluorescencia o de la actividad enzimática relacionada con la sonda).

10 Según otro modo de realización de las sondas nucleicas según la invención, estas últimas pueden ser utilizadas como sondas de captura. En este caso, una sonda denominada "sonda de captura" se inmoviliza sobre un soporte y sirve para capturar mediante hibridación específica el ácido nucleico diana obtenido a partir de la muestra biológica a ensayar y el ácido nucleico diana se detecta a continuación gracias a una segunda sonda denominada "sonda de detección" marcada por un elemento fácilmente detectable.

15 Entre los fragmentos de ácidos nucleicos interesantes, se deben citar así en particular los oligonucleótidos antisentido, es decir cuya estructura asegura, mediante la hibridación con la secuencia diana, una inhibición de la expresión del producto correspondiente. Se deben citar asimismo los oligonucleótidos sentidos que, mediante la interacción con unas proteínas implicadas en la regulación de la expresión del producto correspondiente, inducirán o bien una inhibición, o bien una activación de esta expresión.

20 En un modo de realización particular de la invención, el ácido nucleico según la invención codifica para un polipéptido que posee un fragmento continuo de por lo menos 200 aminoácidos de la proteína SEC ID nº 2, preferentemente 300 aminoácidos, de la manera más preferida para la proteína SEC ID nº 2. Este polipéptido constituye asimismo un objeto de la invención.

En efecto, la presente invención se refiere asimismo a un polipéptido aislado caracterizado porque comprende un polipéptido seleccionado de entre:

- 25 a) un polipéptido de secuencia SEC ID nº 2;
- b) un polipéptido que comprende por lo menos 80% de identidad con dicho polipéptido de a), que desempeña una función en el carácter de pluripotencia de las células ES y que se puede utilizar como marcador del carácter de pluripotencia de las células ES.

Preferentemente, el aminoácido en posición 455 es una treonina.

30 Por el término "polipéptido" se entiende, en el sentido de la presente invención, designar unas proteínas o unos péptidos.

Preferentemente, un polipéptido según la invención es un polipéptido constituido por la secuencia SEC ID nº 2 (que corresponde a la proteína codificada por el gen *ens-1*) o por una secuencia que posee por lo menos 80% de identidad con SEC ID nº 2 después de la alineación óptima.

35 La secuencia del polipéptido presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 80% después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 2, preferentemente 90%, de manera más preferida 98%.

40 Por polipéptido cuya secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferentemente 90%, de manera más preferida 98%, después de la alineación óptima con una secuencia de referencia, se entiende designar los polipéptidos que presentan ciertas modificaciones con respecto al polipéptido de referencia, como en particular una o varias deleciones, unos truncamientos, unos alargamientos, una fusión quimérica y/o una o varias sustituciones.

45 Entre los polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferentemente 90%, de manera más preferida 98%, después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 2 o con uno de sus fragmentos según la invención, se prefieren los polipéptidos variantes codificados por las secuencias nucleicas variantes tales como se han definido anteriormente, en particular los polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos presenta por lo menos una mutación que corresponde en particular a un truncamiento, deleción, sustitución y/o adición de por lo menos un residuo de aminoácido con respecto a la secuencia SEC ID nº 2 o con uno de sus fragmentos, de manera más preferida los polipéptidos variantes que presentan una mutación relacionada con una pérdida de carácter pluripotente de las células que los contienen.

50 La presente invención se refiere asimismo a los vectores de clonación y/o de expresión que comprenden un ácido nucleico o que codifican para un polipéptido según la invención. Dicho vector puede comprender asimismo los elementos necesarios para la expresión y eventualmente para la secreción del polipéptido en una célula hospedante. Dicha célula hospedante constituye asimismo un objeto de la invención.

55 Los vectores caracterizados porque comprenden una secuencia de promotor y/o de regulador según la invención forman parte asimismo de la invención.

Dichos vectores comprenden preferentemente un promotor, unas señales de iniciación y de terminación de la traducción, así como unas regiones apropiadas de regulación de la transcripción. Deben poder ser mantenidos de manera estable en la célula y pueden eventualmente poseer unas señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida.

5 Estas diferentes señales de control se seleccionan en función del hospedante celular utilizado. Para ello, las secuencias de ácido nucleico según la invención pueden ser insertadas en unos vectores de replicación autónoma en el seno del hospedante seleccionado, o unos vectores integrativos del hospedante seleccionado.

10 Entre los sistemas de replicación autónoma, se utilizan preferentemente en función de la célula hospedante unos sistemas de tipo plasmídico o vírico, pudiendo en particular ser los vectores víricos unos adenovirus (Parricaudet *et al.*, 1992), unos retrovirus, unos lentivirus, unos poxvirus o unos virus herpéticos (Epstein *et al.*, 1992). El experto en la materia conoce las tecnologías que se pueden utilizar para cada uno de estos sistemas.

Cuando se desea la integración de la secuencia en los cromosomas de la célula hospedante, se pueden utilizar por ejemplo unos sistemas de tipo plasmídico o vírico; dichos virus son, por ejemplo, los retrovirus (Temin, 1986), o los AAV (Carter, 1993).

15 Entre los vectores no víricos, se prefieren los polinucleótidos desnudos tales como el ADN o el ARN desnudo según la técnica desarrollada por la compañía VICAL, los cromosomas artificiales de bacteria (BAC, bacterial artificial chromosome), los cromosomas artificiales de levadura (YAC, yeast artificial chromosome) para la expresión en la levadura, los cromosomas artificiales de ratón (MAC, mouse artificial chromosome) para la expresión en las células murinas y de manera preferida los cromosomas artificiales de seres humanos (HAC, human artificial chromosome) para la expresión en las células humanas.

20 En las células de pájaros, se podrán utilizar como vector de expresión unos retrovirus, unos adenovirus aviares, unos poxvirus o bien ADN introducido mediante transfección o electroporación.

25 Dichos vectores se preparan según los métodos utilizados habitualmente por el experto en la materia, y los clones que resultan de ello pueden ser introducidos en un hospedante apropiado mediante unos métodos estándares, tales como por ejemplo la lipofección, la electroporación, el choque térmico, la transformación después de la permeabilización química de la membrana, y la fusión celular.

30 La invención comprende además las células hospedantes, en particular las células eucariotas y procariotas, con la excepción de las células ES humanas, transformadas por los vectores según la invención así como los animales transgénicos, preferentemente los pájaros o los mamíferos, salvo el ser humano, que comprenden dichas células transformadas según la invención. En particular, la invención comprende los animales que comprenden el gen *enc-1* que presenta unos marcadores genéticos insertados en éste.

35 Entre las células que se pueden utilizar en el sentido de la presente invención, se pueden citar las células bacterianas (Olins y Lee, 1993), pero también las células de levadura (Buckholz, 1993), así como las células animales, en particular los cultivos de células de mamíferos (Edwards y Aruffo, 1993), y en particular las células de ovario de hámster chino (CHO). Se pueden citar asimismo las células de insectos en las que se pueden utilizar unos procedimientos que utilizan por ejemplo unos baculovirus (Luckow, 1993). Un hospedante preferido para la expresión de las proteínas de la invención está constituido por las células COS.

40 Entre las células de pájaros que se pueden utilizar, se pueden citar las células LMH de hematoma de pollo, las células inmortalizadas de codorniz QT6, los fibroblastos primarios o inmortalizados de pollo, de codorniz, y de pato.

45 La invención se refiere asimismo a una célula hospedante que contiene un ácido nucleico según la invención, caracterizada porque se trata de una célula ES de pájaro modificada además mediante la introducción de un gen exógeno, estando dicho gen exógeno integrado en dicho ácido nucleico según la invención y siendo único y específicamente expresado cuando dicha célula se mantiene en el estado pluripotente. De manera preferida, dicho gen exógeno es un gen informador, seleccionado de entre lacZ GFP, luciferasa, ROSA-β-geo, un gen de resistencia a un antibiótico, en particular los genes de resistencia a la neomicina, la higromicina, la fleomicina, y la puromicina.

Estas células según la invención son muy útiles para el cribado de compuestos que permiten inducir la diferenciación de células pluripotentes, o de medio para el cultivo de células manteniendo al mismo tiempo su carácter pluripotente.

50 Otra célula hospedante de interés según la invención consiste en una célula de pájaro que contiene un ácido nucleico según la invención, modificada además mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno, estando dicho ácido nucleico exógeno integrado en dicho ácido nucleico según la invención. Según un modo de realización preferido de la invención, dicho ácido nucleico exógeno es un gen de interés terapéutico, eventualmente precedido de un promotor espacio-temporal y/o de secuencias de terminación. En otro modo de realización, dicho ácido nucleico es un marcador genético, que se puede seleccionar de entre lacZ GFP, fosfatasa alcalina, trimidina quinasa, y genes de resistencia a los antibióticos (entre los cuales neomicina, higromicina, fleomicina, y puromicina).

55 De manera preferida, las células de pájaro hospedantes descritas anteriormente están caracterizadas porque dicho pájaro pertenece al orden de las galliformes y es en particular un pollo o una codorniz.

En este caso, se integra dicho gen informador bajo el control del promotor del gen *ens-1* de secuencia nucleotídica 3111-3670 de SEC ID nº 1 y/o se integra dicho ácido nucleico exógeno (gen de interés terapéutico y/o marcador genético) en el gen *ens-1*.

5 Se puede modificar asimismo este promotor, reduciendo el número de nucleótidos, o introduciendo nuevos, incluso efectuando unas mutaciones sobre ciertos nucleótidos. El experto en la materia conoce los protocolos para efectuar dichas modificaciones, así como para ensayar el promotor así obtenido para la expresión en las células cepas pluripotentes. Se ha demostrado así en particular que se puede insertar una guanina en posición 3654 de SEC ID nº 1 sin perder la actividad promotora del fragmento así modificado.

10 Así, la invención se refiere asimismo a la utilización de un ácido nucleico que corresponde a los nucleótidos 3111-3670 de SEC ID nº 1 como promotor de un gen de interés para una expresión específica de dicho gen de interés en unas células pluripotentes aviares. Un gen de interés es o bien un gen marcador (luciferasa, GFP,  $\beta$ -galactosidasa, etc.) o bien quizás un gen que codifica para una proteína tal como un factor de crecimiento, una citoquina, una proteína implicada en el reconocimiento inmunitario, una proteína de interés terapéutico, etc. Es interesante observar que la "TATA box" ha sido asimismo identificada, que constituye un objeto de la invención, en los nucleótidos 3645-3651 de SEC ID nº 1.

15 Una célula preferida según la invención es una célula 9N2.5, depositada en la Collection Nationale de Culture des Microorganismes el 11 de mayo de 2000 con el número de orden 1-2477.

20 Las células según la invención son preferentemente unas células ES pluripotentes, pero se debe entender que la invención se refiere asimismo a las células de pájaro diferenciadas, que se derivan de una célula ES según la invención. Se puede efectuar en particular la diferenciación de estas células utilizando ácido retinoico, según las enseñanzas de la solicitud de patente WO 96/12793.

25 La invención se refiere asimismo a los animales transgénicos, salvo el ser humano, que contienen una célula según la invención. Entre los animales según la invención, se prefieren los pájaros, en particular los miembros del orden de las galliformes. Estos pájaros transgénicos serán particularmente interesantes para el estudio de modificaciones en el gen *ens-1* o en su promotor.

Se puede introducir asimismo un ácido nucleico según la invención en unos pájaros y otros animales tales como los roedores, en particular los ratones, las ratas o los conejos, con el fin de expresar un polipéptido según la invención.

30 Estos animales transgénicos se obtienen por ejemplo mediante recombinación homóloga sobre células cepas embrionarias, transferencia de estas células cepas a unos embriones, selección de las quimeras afectadas a nivel de las líneas reproductoras y crecimiento de dichas quimeras. Se pueden obtener asimismo mediante microinyección de ADN desnudo en el ovocito fecundado.

35 Los animales transgénicos según la invención pueden así sobreexpresar el gen que codifica para la proteína según la invención, o su gen homólogo, o expresar dicho gen en el que se introduce una mutación o bien expresar un transgén que comprende unas porciones del gen *ens-1* asociadas a unas secuencias codificantes destinadas a producir una proteína.

40 Alternativamente, los pájaros transgénicos según la invención pueden ser hechos deficientes para el gen que codifica para el polipéptido de secuencia SEC ID nº 2, o un gen homólogo, mediante la desactivación con la ayuda del sistema LOXP/CRE recombinasa (Rohlmann *et al.*, 1996) o de cualquier otro sistema de desactivación de la expresión de este gen.

La invención se refiere asimismo a la utilización de una secuencia de ácido nucleico según la invención para la síntesis de polipéptidos recombinantes según la invención.

45 El método de producción de un polipéptido de la invención en forma recombinante, comprendido a su vez en la presente invención, se caracteriza porque se cultivan las células transformadas, en particular las células o mamíferos de la presente invención, en unas condiciones que permiten la expresión de un polipéptido recombinante codificado por una secuencia de ácido nucleico según la invención, y porque se recupera dicho polipéptido recombinante.

Los polipéptidos recombinantes, caracterizados porque son susceptibles de ser obtenidos mediante dicho método de producción, forman parte asimismo de la invención.

50 Los polipéptidos recombinantes obtenidos como se ha indicado anteriormente, pueden presentarse tanto en forma glucosilada como no glucosilada y pueden presentar o no la estructura terciaria natural.

Las secuencias de los polipéptidos recombinantes pueden asimismo ser modificadas con el fin de mejorar su solubilidad, en particular en los disolventes acuosos.

Dichas modificaciones son conocidas por el experto en la materia tal como, por ejemplo, la delección de dominios hidrófobos o la sustitución de aminoácidos hidrófobos por unos aminoácidos hidrófilos.

55 Estos polipéptidos pueden ser producidos a partir de las secuencias de ácido nucleico definidas anteriormente,

según las técnicas de producción de polipéptidos recombinantes conocidas por el experto en la materia. En este caso, la secuencia de ácido nucleico utilizada se dispone bajo el control de señales que permiten su expresión en un hospedante celular.

5 Un sistema eficaz de producción de un polipéptido recombinante necesita disponer de un vector y de una célula hospedante según la invención.

Estas células pueden ser obtenidas mediante la introducción en unas células hospedantes de una secuencia nucleotídica insertada en un vector tal como se ha definido anteriormente, y después el cultivo de dichas células en unas condiciones que permiten la replicación y/o la expresión de la secuencia nucleotídica transflectada.

10 Los procedimientos utilizados para la purificación de un polipéptido recombinante son conocidos por el experto en la materia. El polipéptido recombinante puede ser purificado a partir de lisados y de extractos celulares, del sobrenadante del medio de cultivo, mediante unos métodos utilizados individualmente o en combinación, tales como el fraccionamiento, los métodos de cromatografía, las técnicas de inmunoafinidad con la ayuda de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos, etc.

15 Los polipéptidos según la presente invención se pueden obtener asimismo mediante síntesis química utilizando una de las numerosas síntesis peptídicas conocidas, por ejemplo las técnicas que utilizan unas fases sólidas (véase en particular Stewart *et al.*, 1984) o unas técnicas que utilizan unas fases sólidas parciales, mediante condensación de fragmentos o mediante una síntesis en disolución clásica.

Los polipéptidos obtenidos mediante síntesis química y que pueden comprender unos aminoácidos no naturales correspondientes están comprendidos asimismo en la invención.

20 Los anticuerpos mono o policlonales o sus fragmentos, anticuerpos quiméricos o inmunoconjugados, caracterizados porque son capaces de reconocer específicamente un polipéptido según la invención, forman parte de la invención.

25 Unos anticuerpos policlonales específicos pueden ser obtenidos a partir de un suero de un animal inmunizado contra los polipéptidos según la invención, en particular producido mediante recombinación genética o mediante síntesis peptídica, según los modos de realización habituales.

Se observa asimismo el interés de anticuerpos que reconocen de manera específica ciertos polipéptidos, variantes, o sus fragmentos inmunógenos, según la invención.

30 Se prefieren particularmente los anticuerpos mono o policlonales o sus fragmentos, anticuerpos quiméricos o inmunoconjugados, caracterizados porque son capaces de reconocer específicamente el polipéptido de secuencia SEC ID nº 2.

Los anticuerpos monoclonales específicos se pueden obtener según el método clásico de cultivo de hibridomas descrito por Köhler y Milstein (1975).

35 Los anticuerpos según la invención son, por ejemplo, unos anticuerpos quiméricos, unos anticuerpos humanizados, unos fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>. Pueden presentarse asimismo en forma de inmunoconjugados o de anticuerpos marcados con el fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

La invención se refiere asimismo a unos métodos para la detección y/o la purificación de un polipéptido según la invención, caracterizados porque utilizan un anticuerpo según la invención.

La invención comprende además unos polipéptidos purificados, caracterizados porque se obtienen mediante un método según la invención.

40 Por otra parte, además de su utilización para la purificación de los polipéptidos, los anticuerpos de la invención, en particular los anticuerpos monoclonales, pueden ser utilizados asimismo para la detección de estos polipéptidos en una muestra biológica.

45 Constituyen así un medio de análisis inmunocitoquímico o inmunohistoquímico de la expresión de los polipéptidos según la invención, en particular el polipéptido de secuencia SEC ID nº 2 o una de sus variantes, sobre unos cortes de tejidos específicos, por ejemplo mediante inmunofluorescencia, marcado con oro, e inmunoconjugados enzimáticos.

Pueden permitir en particular demostrar la expresión de estos polipéptidos en los tejidos o en las muestras biológicas.

50 Más generalmente, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar ventajosamente en cualquier situación en la que se deba observar la expresión de un polipéptido según la invención, normal o mutado.

Así, un procedimiento de detección de un polipéptido según la invención en una muestra biológica, que comprende las etapas de puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo según la invención y de demostración del complejo antígeno-anticuerpo formado constituye asimismo un objeto de la invención, así como un kit que permite realizar dicho procedimiento. Dicho kit comprende en particular:

- a) un anticuerpo monoclonal o policlonal según la invención;
- b) eventualmente unos agentes reactivos para la constitución de un medio propicio para la reacción inmunológica;
- c) los agentes reactivos que permiten la detección del complejo antígeno-anticuerpo producido durante la reacción inmunológica.

5 Estos anticuerpos se pueden obtener directamente a partir de suero humano, o a partir de animales inmunizados con unos polipéptidos según la invención y después "humanizados".

Los anticuerpos según la invención son muy útiles para determinar la presencia del polipéptido SEC ID nº 2 y permiten así determinar el carácter pluripotente de una célula ES de pájaro.

10 Un procedimiento de determinación del carácter pluripotente de una célula ES de pájaro, caracterizado porque se determina la presencia de expresión del gen que corresponde a SEC ID nº 1 o del ARNm de SEC ID nº 1 constituye asimismo un objeto de la invención.

15 En efecto, la invención da a conocer la secuencia del gen *ens-1*, que está específicamente expresada en las células ES de pájaro, en particular de las galliformes, cuando éstas son pluripotentes. Los métodos de detección de la expresión de un gen aplicados a este gen permiten por lo tanto conocer rápidamente la naturaleza de las células estudiadas.

En particular, tal como se ha descrito anteriormente, se puede detectar el producto de expresión del gen, utilizando por ejemplo unos anticuerpos según la invención, mediante transferencia western u otros métodos descritos anteriormente.

20 Se puede asimismo efectuar la detección del ARNm de SEC ID nº 1 mediante transferencia Northern o mediante RT-PCR utilizando una sonda o unos cebadores según la invención.

La detección de la expresión de este gen se puede efectuar asimismo utilizando un chip de ADN o un chip de proteína, que contienen respectivamente un ácido nucleico o un polipéptido según la invención. Dichos chips constituyen asimismo unos objetos de la invención.

25 Un chip de proteínas según la invención permite asimismo el estudio de las interacciones entre los polipéptidos según la invención y otras proteínas o unos compuestos químicos, y puede así ser útil para el cribado de compuestos que interactúan con los polipéptidos según la invención.

30 Los solicitantes han mostrado que el gen *ens-1* se encuentra únicamente en los pájaros de la familia de las galliformes. Así, la invención se refiere asimismo a un procedimiento de clasificación de la pertenencia de un pájaro al orden de las galliformes, caracterizado porque se detecta, en el genoma de dicho pájaro, la presencia de un ácido nucleico seleccionado de entre un ácido nucleico según la invención, en particular SEC ID nº 1, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias.

35 Esta propiedad de que el gen *ens-1* se encuentren únicamente en las galliformes permite definir un procedimiento de determinación de la presencia de una muestra que procede de un pájaro del orden de las galliformes en una muestra alimenticia, caracterizado porque se detecta, en dicha muestra, la presencia de un ácido nucleico seleccionado de entre un ácido nucleico según la invención, en particular SEC ID nº 1, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias.

40 Se puede detectar la presencia de un ácido nucleico según la invención en una muestra biológica o alimenticia, o en el genoma de un pájaro, mediante diferentes maneras. En particular, se puede definir un procedimiento de detección y/o de determinación de un ácido nucleico según la invención en una muestra biológica, o alimenticia, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto dicha muestra con un polinucleótido marcado seleccionado de entre un polinucleótido según la invención, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias;
- b) detectar y/o dosificar el híbrido formado entre dicho polinucleótido y el ácido nucleico de dicha muestra.

50 Se puede proceder asimismo a la detección y/o a la dosificación de un ácido nucleico según la invención en una muestra biológica o alimenticia, efectuando una etapa de amplificación de los ácidos nucleicos de dicha muestra con la ayuda de cebadores seleccionados de entre los ácidos nucleicos según la invención, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias.

55 Tal como se demuestra en los ejemplos, el ácido nucleico según la invención está expresado en las células ES de pájaro sólo cuando éstas poseen un carácter pluripotente. Por otra parte, las células ES modificadas según la invención, con un gen informador expresado específicamente cuando son pluripotentes, y en particular las células 9N2.5 se pueden utilizar para cribar unos compuestos de interés.

En particular, pueden ser utilizadas en un procedimiento de cribado de una sustancia o de un medio capaces de inducir una diferenciación de células pluripotentes, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) mantener las células ES, con la excepción de las células ES humanas, según la invención, en un medio de cultivo que permite el mantenimiento del fenotipo pluripotente;
- b) añadir dicha sustancia en dicho medio de cultivo o sustituir dicho medio de cultivo por el medio a ensayar;
- c) determinar la inducción de la diferenciación por la ausencia de expresión de la proteína SEC ID nº 2 o del gen exógeno.

Este procedimiento se lleva a cabo preferentemente con unas células ES modificadas por inserción de un gen informador bajo el control del promotor del gen *ens-1*, y se detecta la ausencia de expresión de dicho gen informador. Se utilizan preferentemente las células 9N2.5, y se detecta la ausencia de expresión de la  $\beta$ -galactosidasa.

Se pueden utilizar asimismo las células según la invención para cribar unas sustancias capaces de restaurar el carácter pluripotente de células diferenciadas que se derivan de células ES de pájaro según la invención, modificadas además por introducción de un gen exógeno, estando dicho gen exógeno integrado en el ácido nucleico según la invención y siendo única y específicamente expresado cuando dicha célula se mantiene en el estado pluripotente, mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- a) mantener dichas células diferenciadas en un medio de cultivo adecuado;
- b) sustituir dicho medio de cultivo por un medio que permite mantener un fenotipo pluripotente, y que contiene dicha sustancia a ensayar;
- c) determinar la restauración del carácter pluripotente de dichas células por la expresión de la proteína SEC ID nº 2 o del gen exógeno, en dichas células.

Este procedimiento se realiza nuevamente ventajosamente con unas células diferenciadas según la invención, modificadas por inserción de un gen informador en el gen *ens-1* o bajo el control de su promotor. Se utilizan ventajosamente unas células 9N2.5 diferenciadas, que permiten la detección de la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa.

Los procedimientos descritos anteriormente constituyen asimismo unos objetos de la invención, así como los medios o sustancias obtenidos mediante dichos procedimientos.

Dicha sustancia según la invención puede ser un compuesto que tiene una estructura química (del tipo pequeña molécula orgánica), un lípido, un azúcar, una proteína, un péptido, un compuesto híbrido proteína-lípido, proteína-azúcar, péptido-lípido o péptido-azúcar, una proteína o un péptido sobre el cual se han añadido unas ramificaciones químicas.

Entre los compuestos químicos previstos, éstos pueden contener uno o varios ciclos, aromático(s) o no, así como varios residuos de cualquier tipo (en particular alquilo inferior, es decir que presenta entre 1 a 6 átomos de carbono).

Es extremadamente importante determinar los genes implicados en el carácter de pluripotencia de las células ES, o beneficiarse de un marcador de dicho carácter. En efecto, debido a la capacidad de estas células para participar en la morfogénesis de todos los tejidos, una modificación genética de éstas permite asegurar que el carácter buscado se encontrará en todos los tejidos del animal formado. Por otra parte, la introducción de genes exógenos al locus del gen *ens-1* bajo el control de promotores de especificidad espacio-temporal variable puede permitir la obtención de animales transgénicos que expresan dichos genes en unos tejidos en unas etapas de desarrollo dadas. En efecto, siendo la especificidad del gen *ens-1* que se expresa sólo si la célula hospedante posee el carácter pluripotente, la introducción de un ácido nucleico exógeno en este locus no debería molestar el desarrollo del embrión.

Se puede por lo tanto introducir unos genes de interés terapéutico, por ejemplo que codifican para unas proteínas terapéuticas (hormonas, factores de crecimiento, linfoquinas), con el fin de poder producir estas proteínas durante el desarrollo del embrión. En efecto, puede ser muy interesante producir unas proteínas terapéuticas en los huevos, cuya cáscara asegura un entorno estéril.

Se pueden utilizar asimismo unas células pluripotentes según la invención con el fin de hacer que colonicen el tejido germinal de animales, en particular de pájaros, de manera más preferida del orden de las galliformes, con el fin de que unos caracteres genéticos particulares puedan ser transmitidos a sus descendientes. Esto permite la mejora de razas industriales de pollos, de pavos, de codornices u otros de manera particularmente interesante económicamente.

Se pueden utilizar asimismo los compuestos seleccionados de entre:

- a) un ácido nucleico según la invención;
- b) un polipéptido según la invención;
- c) un vector según la invención;

- d) una célula según la invención;
- e) un anticuerpo según la invención;

a título de medicamento con el fin de permitir, según el caso, la restauración del carácter pluripotente de células de pájaros, o por el contrario, de inducir la diferenciación de células ES.

5 La presente invención abre por lo tanto la vía a una mejor caracterización del carácter pluripotente de las células ES, proporcionando la secuencia de un marcador de estas células. Sin embargo, queda por determinar si este gen es un factor esencial de este carácter. Así, la introducción del gen *ens-1* en unas células diferenciadas, por ejemplo sobre un plásmido bajo el control de un promotor adaptado, y el estudio de la restauración eventual del carácter pluripotente de estas células permitirá responder a esta pregunta. Entre los promotores adaptados, se seleccionará un promotor inducible, por ejemplo con un azúcar, y se determinará el carácter pluripotente de las células cuando se deja de inducir la expresión del gen sobre el plásmido. Se puede construir asimismo un plásmido que conduce a una escisión del gen *ens-1* después de un cierto tiempo (por ejemplo disponiéndolo entre dos secuencias loxP, e introduciendo un segundo plásmido que codifica para la recombinasa Cre). Para determinar el carácter pluripotente de las células, puede ser ventajoso utilizar las células 9N2.5 según la invención, y buscar la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa después de la introducción del plásmido que codifica para *ens-1*.

Si es posible determinar que el gen *ens-1* es inductor del carácter pluripotente de las células, se puede realizar un procedimiento de restauración de dicho carácter (asimismo objeto de la invención), caracterizado porque se expresa el gen *ens-1* en unas células diferenciadas. Se pueden utilizar los métodos descritos anteriormente, proporcionándoles ciertas mejoras conocidas por el experto en la materia.

20 Los ejemplos siguientes permiten ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos de la invención.

#### **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: Estructura del vector ROSA- $\beta$ -geo utilizado para transformar las células ES.

25 Figura 2: análisis de la expresión del transcrito ROSA- $\beta$ -geo mediante RT-PCR en las células 9N2.5 durante la inducción de la diferenciación por el ácido retinoico (+RA), el DMSO (+DMSO) o los dos simultáneamente (+RA+DMSO). El medio de control no contiene ningún factor inductor.

Figura 3: análisis de la expresión del transcrito ROSA- $\beta$ -geo mediante transferencia Northern durante la inducción de la diferenciación por el ácido retinoico. La transferencia se hibrida con una sonda LacZ.

30 Figura 4: análisis de la expresión del transgén ROSA- $\beta$ -geo mediante revelación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en unos embriones quiméricos para las células 9N2.5.

Figura 5: análisis mediante PCR de la presencia del transgén ROSA- $\beta$ -geo en los embriones quiméricos. Se ha extraído ADN o bien de células 9N2.5, o bien del embrión quimérico de 48 horas o 4 días de edad, que resulta del trasplante de las células 9N2.5, o bien de embrión de control de 48 horas o de 4 días de edad.

35 Figura 6: detección mediante transferencia Southern de la presencia del transgén ROSA- $\beta$ -geo en el ADN genómico de las células 9N2.5 después de la digestión mediante *EcoRI* (E) o *DraI* (D).

Figura 7: detección mediante transferencia Northern de la presencia de un transcrito que comprende el transgén ROSA- $\beta$ -geo, mediante hibridación con una sonda Lac Z.

40 Figura 8: A. análisis mediante transferencia Northern de la expresión del gen *ens-1* en unas células ES normales de pollo y en las células 9N2.5, después de la hibridación por las sondas C1, S1 y S2. B. estructura del ADN complementario del gen *ens-1*. (RS = secuencias repetidas, ORF = marco de lectura). Las flechas representan las sondas C1, S1 y S2 utilizadas para la hibridación.

45 Figura 9: análisis mediante transferencia Northern de la expresión de los transcritos *ens-1* en las células cepas embrionarias normales de pollo, en las células 9N2.5, en el embrión de pollo en diferentes etapas de desarrollo y en diferentes órganos de polluelo. Los ARN poliA+ aislados a partir de los ARN totales han sido hibridados sobre las transferencias con las sondas C1 o S1, o con una sonda de control GAPDH.

Figura 10: análisis de la expresión del transcrito *ens-1* en el embrión de pollo mediante hibridación *in situ*.

Figura 11: Amplificación mediante PCR realizada sobre el ADN genómico de diferentes especies aviares con los cebadores *ens1 S1* (SEC ID n° 14) y *ens1 AS1* (SEC ID n° 15).

50 Figura 12: esquema de la organización de los LTR de retrovirus, de la organización esperada para el gen *ens-1*, así como de las dos construcciones utilizadas para la identificación del promotor.

Figura 13: actividad de los promotores en diferentes líneas celulares (S: promotor sentido, AS: promotor antisentido)

Figura 14: actividad del promotor 2 (figura 12) durante la diferenciación de las células ES.

### EJEMPLOS

#### EJEMPLO 1: Construcción de una célula ES de pollo que contiene un marcador genético de la pluripotencia

5 Con el fin de identificar un gen específicamente expresado en las células ES pluripotentes, se ha seguido la estrategia denominada de "captura de gen" (*gen trap*). Esta estrategia consiste en introducir, en el genoma de las células ES, un gen marcador que comprende una secuencia codificante exógena pero que está desprovisto de promotor propio. La inserción aleatoria de este marcador en el genoma de la célula conducirá en ciertos casos a disponer este gen exógeno corriente abajo de un promotor propio del genoma celular. El gen exógeno adopta, en esta configuración, una regulación de expresión muy similar, si no idéntica, a la del gen el en que se inserta. El seguimiento de la expresión del gen marcador en las células así modificadas informa entonces sobre el patrón de expresión del gen celular así "marcado".

15 Como sistema de captura de gen, los inventores han utilizado el que explota las propiedades del vector ROSA- $\beta$ -geo descrito por Friedrich y Soriano (1991). Este sistema está constituido por un plásmido que contiene los dos genes respectivamente LacZ y Neo<sup>R</sup> fusionados entre sí en el orden 5'-3'. Este gen de fusión codifica para una proteína única LacZ-Neo que confiere a las células que la producen al mismo tiempo la resistencia al G418 y la actividad  $\beta$ -galactosidasa. La estructura del plásmido está representada en la figura 1. Este plásmido ha sido cortado por la enzima *DraI* que induce su linealización. El plásmido linealizado ha sido introducido en unas células ES de pollo mediante la técnica de electroporación. Para ello, se ha utilizado un cultivo de células ES de pollo mantenido en las condiciones descritas en Pain *et al.* (1996). Las células ES se recogieron a partir de cajas de cultivo mediante tratamiento con pronasa. Las células en suspensión han sido lavadas y suspendidas en medio de Glasgow a la concentración de  $5 \times 10^6$  en 0,8 ml. Diez microgramos de plásmido linealizado han sido añadidos a la suspensión celular que se mantuvo durante 10 minutos a 4°C. Después, la suspensión se sometió a un tratamiento de electroporación que consiste en 2 simulaciones eléctricas en las condiciones siguientes: 280 V, 500 mF en una cuba de 1 mm de grosor en un aparato *BioRad electroporator*. Las células han sido después mantenidas durante 10 minutos a 4°C antes de ser inoculadas en cultivo según el procedimiento descrito en Pain *et al.* (1996), incorporado a título de referencia. Treinta y seis horas después los cultivos han sido adicionados con G418 a la concentración de 250  $\mu$ g/ml. El medio de cultivo que contiene el G418 ha sido después cambiado todos los días durante 4 días, y después cada dos días. Unos clones de células ES resistentes al G418 se han vuelto visibles después del sexto día. Se recogieron individualmente entre 8 y 10 días después del inicio del cultivo. Estos clones se inocularon individualmente en medio de cultivo fresco que contiene G418 con el fin de ser amplificados. Después, se conservaron en nitrógeno líquido.

25 En las células electroporadas, la expresión del marcador ROSA- $\beta$ -geo ha sido analizada mediante la identificación *in situ* de la actividad  $\beta$ -galactosidasa según el procedimiento siguiente. Las células en suspensión se fijaron a 4°C durante un tiempo de 30 minutos en una mezcla a base de PBS que contiene 1% de formaldehído, 0,2% de glutaraldehído y 0,02% de Nonidet P-40. Las células se incubaron después a 37°C durante un tiempo que puede estar comprendido entre 1 y 24 horas en PBS que contiene 1 mg/ml de 5-bromo-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopuranósido, 5 mM de K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>, 5 mM de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,02% de Nonidet P-40. Las células que expresan el marcador  $\beta$ -galactosidasa estaban coloreadas en azul.

35 El objetivo era identificar unas células ES en las que el vector ROSA- $\beta$ -geo estuviera insertado corriente abajo de un promotor que funcionaría sólo en unas células ES cuando éstas son pluripotentes. Después de la caracterización de varios clones, se ha seleccionado un clon, denominado 9N2.5, que presentaba la reacción positiva del ensayo  $\beta$ -galactosidasa sólo cuando las células estaban mantenidas en unas condiciones de cultivo asegurando la persistencia del carácter pluripotente de las células tales como se describen en Pain *et al.* (1996). La positividad del ensayo se perdió cuando las células 9N2.5 fueron inducidas en la diferenciación (véase más adelante).

45 El clon 9N2.5 ha sido amplificado en cultivo *in vitro* y después almacenado en forma viable por congelación en nitrógeno líquido.

#### EJEMPLO 2: Caracterización de las células 9N2.5

50 Las células 9N2.5 han sido mantenidas en las condiciones de cultivo descritas por Pain *et al.* (1996) para las células ES de pollo. En estas condiciones se ha verificado que las células 9N2.5 presentaban la morfología, la actividad telomerasa y los epítomos antigénicos característicos de las células ES de pollo tales como los descritos por Pain *et al.* Estas células son asimismo capaces de formar unos cuerpos embrioides, como las células parentales. La electroporación, la selección en el G418 y la amplificación ulterior de estas células no habían alterado por lo tanto posteriormente sus caracteres de células ES.

55 Para analizar la expresión del marcador ROSA- $\beta$ -geo en las células diferenciadas, las células 9N2.5 fueron inducidas en la diferenciación según los procedimientos descritos en Pain *et al.* Estas células fueron cultivadas en ausencia de células nutritivas, en ausencia de LIF y de citoquinas y en presencia o bien de ácido retinoico a la concentración de  $5 \times 10^{-6}$  M, o bien de DMSO a la concentración de 1%. En algunos cultivos, el ácido retinoico y el DMSO fueron añadidos simultáneamente. En los medios que inducen la diferenciación de las células ES se ha podido observar la aparición de células diferenciadas idénticas a las que fueron descritas inicialmente por Pain *et al.* (1996) en las mismas condiciones.

Después de 4 días de cultivo en los medios de diferenciación, las células se volvieron completamente negativas para el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Con el fin de confirmar la ausencia de expresión del transgén ROSA- $\beta$ -geo, su expresión fue seguida o bien por la búsqueda de los ARNm LacZ o bien por la técnica de RT-PCR. Para ello, los cebadores SEC ID n° 3 y SEC ID n° 4 fueron utilizados:

5 Tal como se muestra en la figura 2, la cantidad de ARN producida por el transgén ROSA- $\beta$ -geo no cambia durante los 5 días de cultivo de las células en el medio de cultivo que mantiene la pluripotencia (medio ES). Por el contrario, en los medios de cultivo de diferenciación que contienen o bien el ácido retinoico solo, o bien el DMSO, o bien el ácido retinoico y el DMSO, la cantidad de ARNm ROSA- $\beta$ -geo disminuyó en gran medida después de 4 días de cultivo. Para confirmación, los ARNm ROSA- $\beta$ -geo fueron analizados asimismo mediante la técnica de *transferencia*  
10 *Northern* utilizando una sonda marcada específica de la secuencia LacZ. Tal como se ha mostrado en la figura 3, en presencia de ácido retinoico, los ARNm LacZ se volvieron casi indetectables después de dos días de cultivo mientras que su expresión se mantenía en el medio de cultivo desprovisto de ácido retinoico.

### Conclusión

15 Las células 9N2.5 expresan selectivamente el transgén ROSA- $\beta$ -geo cuando se mantienen en el estado pluripotente. La expresión del transgén se detiene muy rápidamente después de la inducción de la diferenciación de estas células en cultivo.

### **EJEMPLO 3: Ensayo de la expresión del transgén ROSA- $\beta$ -geo en las células 9N2.5 *in vivo***

20 Con el fin de analizar las potencialidades de desarrollo de las células 9N2.5 y la expresión del transgén ROSA- $\beta$ -geo en un embrión *in vivo*, las células 9N2.5 han sido injertadas en unos embriones de pollo en la etapa X según la escala de Eyal-Giladi y Kochav (1976) (escala E-G&K) según el protocolo descrito por Pain *et al.* (1996). La presencia de los descendientes de las células injertadas ha sido buscada en los embriones en diferentes etapas de desarrollo después del injerto, mediante el ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa. Tal como se ha ilustrado en la figura 4, unas masas de células positivas para  $\beta$ -galactosidasa fueron detectadas en el epiblasto de los embriones que han alcanzado la etapa XIII en los embriones injertados. Estas células positivas fueron identificadas sólo en el epiblasto de la zona pelúcida.  
25 Más tarde durante el desarrollo, en la etapa de la gastrulación, etapa 5 según la escala de Hamburger y Hamilton (H&H), unas células positivas fueron encontradas sólo en la línea primitiva y el crecimiento germinal extra-embriionario. En la línea primitiva, las células fueron identificadas en algunas masas en su mayoría localizadas en el nudo de Hensen. En la etapa 13 (escala H&H), unas células positivas fueron encontradas sólo en el seno romboidal que corresponde a la placa neural todavía abierta en la parte caudal del embrión. Más tarde durante el desarrollo embrionario, unas células positivas han sido encontradas sólo en forma de células muy raras aisladas en ciertos tejidos de origen nervioso, así como en los esbozos gonádicos.

30 Con el fin de verificar si, a pesar de la negatividad de la reacción  $\beta$ -galactosidasa, de los descendientes de las células 9N2.5 habían colonizado bien en número los tejidos de embriones mayores, la presencia del transgén ROSA- $\beta$ -geo ha sido buscada mediante PCR en el ADN extraído a partir de embrión completo de 2 ó 4 días de edad de desarrollo. Tal como se muestra en la figura 5, una banda característica del transgén ROSA- $\beta$ -geo ha podido ser detectada, demostrando que las células descendientes de las células 9N2.5 injertadas estaban presentes por lo menos 4 días después del injerto.

40 Algunos embriones injertados con unas células 9N2.5 han terminado su desarrollo y han dado lugar a polluelos. La búsqueda de las secuencias del transgén ROSA- $\beta$ -geo ha sido realizada sobre el ADN aislado de diversos tejidos mediante la técnica de PCR. Así, en dos polluelos analizados se ha revelado la presencia del transgén en la piel, la molleja, y el hígado. Todos estos tejidos no presentaban ninguna actividad  $\beta$ -galactosidasa, lo cual demuestra que los transgenes estaban presentes en unas células diferenciadas procedentes de las células 9N2.5 injertadas.

### Conclusión

45 Las células 9N2.5 son por lo tanto capaces de colonizar un embrión hospedante y de desarrollarse en el mismo. Sin embargo, la expresión del transgén ROSA- $\beta$ -geo sigue siendo limitada en las células muy pronto después del trasplante en el embrión así como en raras células presentes en algunos tejidos tales como las gónadas o el sistema nervioso. Teniendo en cuenta las observaciones efectuadas sobre las células 9N2.5 en cultivo, se puede imaginar razonablemente que la expresión del transgén ROSA- $\beta$ -geo en las células *in vivo* se limita a las células que no están todavía implicadas en la diferenciación.

50 El conjunto de estos datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* a partir de las células 9N2.5 lleva a suponer que el transgén ROSA- $\beta$ -geo está insertado en un locus del genoma de estas células cuya actividad transcripcional es específica de unas células ES en el estado pluripotente.

### **EJEMPLO 4: Proliferación de las células 9N2-5 *in vivo***

55 Con el fin de analizar si las células 9N2.5 eran capaces de proliferar en ciertos compartimentos del embrión, se han extraído después de 7 días de incubación dos embriones injertados. Los embriones han sido cortados arbitrariamente en 3 partes: la cabeza, el tronco incluyendo los esbozos de los miembros superiores, y la cola incluyendo los esbozos de los miembros inferiores. Estas partes han sido disociadas en la pronasa y la suspensión celular inoculada en cultivo según el procedimiento de cultivo descrito por Pain *et al.* (1996). Una selección con G418 a 250  $\mu$ g/ml se realizó durante 6 días. Aparecieron algunos focos de células resistentes en todos los cultivos, pero la

frecuencia de estos focos era mucho más elevada en los cultivos inoculados a partir de la parte posterior de los embriones. Las células resistentes al G418 procedentes de este cultivo fueron re-inoculadas para ser amplificadas, 7 días después de la inoculación inicial. Una parte de estos cultivos paralelos fue ensayada positivamente para la expresión de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Este enfoque ha permitido para uno de los 2 embriones ensayados, mantener, amplificar e incluso congelar, en forma viable, unas células positivas para la  $\beta$ -galactosidasa, resistentes al G418 y que presentaban una morfología idéntica a la de las células 9N2.5 inyectadas. Las células procedentes del segundo embrión, a pesar de ser positivas para la actividad  $\beta$ -galactosidasa, han proliferado sólo lentamente y no han podido ser suficientemente amplificadas.

### Conclusión

Estos resultados muestran por lo tanto que ciertas células 9N2.5 son capaces de mantenerse en forma de células ES en ciertas regiones del embrión. Estas células corresponden aparentemente a las raras células positivas para la  $\beta$ -galactosidasa identificadas sobre los pares de embriones inyectados con las células 9N2.5 (véase anteriormente). Con respecto a su localización en la parte posterior del embrión, se puede sugerir que ciertas de las células que conservan los caracteres de las células 9N2.5 *in vivo* corresponden a unas células EG tales como se han descrito en el ratón y en el ser humano (Matsui *et al.* 1992, Shambloott *et al.*, 1998). Las células EG son unas células precursoras de las células germinales que poseen unas propiedades de pluripotencia y unos caracteres citológicos muy próximos a los de las células ES.

### **EJEMPLO 5: Utilización de las células 9N2.5 para un cribado de sustancias**

Las células 9N2.5 presentan una expresión de la  $\beta$ -galactosidasa fuerte cuando se encuentran en un estado indiferenciado. Esta expresión se pierde durante una inducción de diferenciación. Esta propiedad se puede aprovechar para ensayar diferentes moléculas inductoras o promotoras de la diferenciación o para ensayar unas moléculas no inductoras. Las células 9N2.5 pueden así ser utilizadas como soporte de ensayo para identificar unos lotes de suero apropiados para el cultivo de células ES o bien para su diferenciación. Para ello, las células se inoculan en un medio idéntico al utilizado para mantener las células parentales. En este medio, el suero de referencia se sustituye por los diferentes sueros a ensayar, a diferentes concentraciones eventualmente. Las inoculaciones se realizan a muy baja densidad ( $2 \times 10^4$  células por caja de 35 mm) y las células se cultivan durante 4 días. Las células son entonces fijadas, coloreadas para revelar la actividad  $\beta$ -galactosidasa y se estimó el número de focos positivos. El número de focos positivos está en relación directa con la capacidad del suero para mantener la auto-renovación de las células ES. Este ejemplo puede ser extendido al ensayo de sustancias diversas, naturales o de síntesis.

### Conclusión

Las células 9N2.5 pueden ser utilizadas para cribar unas sustancias sobre su aptitud para inducir la auto-renovación o la diferenciación de células ES en cultivo.

### **EJEMPLO 6: Identificación del locus de integración del transgén ROSA- $\beta$ -geo en las células ES 9N2.5**

En un primer enfoque hacia la identificación del locus de integración del transgén ROSA- $\beta$ -geo en las células 9N2.5, se ha efectuado un análisis del ADN genómico de las células 9N2.5 mediante la técnica de transferencia Southern. El ADN de las células 9N2.5 fue digerido por la enzima de restricción *EcoRI* o por la enzima *DraI* que cortan cada una el transgén ROSA- $\beta$ -geo sólo en un sitio único. Después de la migración electroforética del ADN digerido, los filtros fueron hibridados con una sonda específica del fragmento LacZ. Tal como se muestra en la figura 6, una sola banda ha sido identificada en estas condiciones en cada una de las digestiones practicadas. No se identificó ninguna banda en el ADN de células ES normales de pollo que no contienen el transgén ROSA- $\beta$ -geo. Estos resultados demuestran que, en las células 9N2.5, una sola copia del transgén ROSA- $\beta$ -geo está integrada.

En un segundo tiempo, se ha analizado el tamaño del ARNm transcrito a partir del transgén. Se ha analizado ARN de células 9N2.5 mediante transferencia Northern con una sonda LacZ. Tal como se muestra en la figura 7, se ha revelado un solo transcrito de tamaño de 4,7 kb. Este transcrito no está presente en el ARN de células ES normales. Teniendo en cuenta la longitud esperada de la secuencia que debe ser transcrita en el transgén ROSA- $\beta$ -geo, es decir 3,9 kb, se debe imaginar que el transcrito revelado en las células 9N2.5 contiene aproximadamente 0,8 kb de secuencias procedentes del gen celular en el que se inserta el transgén. Estas secuencias celulares pueden situarse en el ARNm o bien en dirección 5', o bien en dirección 3', o bien estar repartidas por ambos lados de la secuencia transcrita del transgén ROSA- $\beta$ -geo. Con el fin de buscarlas en la región 5', se ha utilizado la técnica 5'-RACE utilizando el kit *Marathon* de la compañía Clontech.

A partir de ARN de células 9N2.5, se sintetizó una hebra de ADN complementaria utilizando un cebador específico de la región LacZ, cebador de secuencia (SEC ID nº 5).

Después de la síntesis de la segunda hebra complementaria de esta primera hebra, el ADN complementario de doble hebra fue unido al adaptador suministrado en el kit *Marathon* cuya secuencia es SEC ID nº 6. El conjunto de la secuencia fusionada fue después amplificada mediante la técnica de PCR utilizando los cebadores SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8.

La amplificación fue realizada sobre una máquina *2400 Perkin Elmer* en las condiciones siguientes: 94°C durante 30 segundos, después 5 ciclos a 94°C de 5 segundos cada uno, después 4 minutos a 72°C, después 5 ciclos a 94°C de 5 segundos cada uno, después 4 minutos a 70°C, después 25 ciclos a 94°C de 5 segundos cada uno, y

5 después 4 minutos a 68°C. Un producto de amplificación de 400 pares de bases fue identificado. Este fragmento denominado F1 fue clonado en un plásmido para ser amplificado, y después se determinó su secuencia exacta. A continuación se han buscado unas secuencias situadas corriente abajo de la secuencia F1 sobre el ARNm transcrito en las células ES utilizando la técnica de RT-PCR. Para ello, el ARN de las células ES normales fue utilizado como matriz para sintetizar un ADN complementario por cebado mediante un cebador P3 de secuencia SEC ID nº 9.

El ADN complementario monocatenario fue después amplificado mediante PCR por medio de los cebadores SEC ID nº 10 que corresponden a la secuencia 5' del fragmento inicialmente amplificado por la técnica 5'-RACE, y SEC ID nº 11.

10 Un fragmento denominado C1 fue así amplificado y después clonado en un plásmido. Se determinó la secuencia exacta de C1 (SEC ID nº 12).

Con el fin de confirmar que la secuencia C1 está bien en los ARNm que contienen asimismo la secuencia LacZ en las células 9N2.5, se ha efectuado una amplificación mediante RT-PCR sobre los ARNm procedentes de estas células utilizando los cebadores respectivos P4 (SEC ID nº 13), específico del fragmento C1, y LacZB (SEC ID nº 8), específico de la secuencia LacZ.

15 Se identificó un fragmento de 331 pares de bases. El tamaño de este fragmento corresponde al esperado, lo cual indica que la secuencia C1 y la secuencia LacZ se encuentran bien en un mismo ARNm. La confirmación fue asimismo aportada porque la secuencia C1 debe ser específica del gen celular en el que se inserta el transgén ROSA- $\beta$ -geo. Este gen se ha denominado *ens-1* (embryonic normal stem cell gene).

20 Con el fin de verificar que el gen *ens-1* produce bien un ARN mensajero, los ARN de células ES normales de pollo han sido analizados mediante la técnica de transferencia Northern por medio de la sonda C1. Tal como se ha mostrado en la figura 8A, la sonda C1 identifica un ARN principal de tamaño próximo a 4,7 kb así como dos ARN marcados muy débilmente de aproximadamente 10 kb a y kb respectivamente.

A partir de la secuencia C1, se ha realizado la clonación del ARNm completo transcrito a partir del gen *ens-1*.

25 Para ello, un banco de ADNc construido a partir de ARN poliadenilados aislados de las células ES de pollo ha sido cribado con unas sondas preparadas a partir del fragmento C1.

30 Un ADN complementario de 4,2 kpb ha sido aislado. Con el fin de verificar si este ADNc es bien representativo del ARNm transcrito a partir del gen *ens-1*, se han preparado dos sondas nucleotídicas, respectivamente S1 y S2, que corresponden a dos fragmentos diferentes de este ADNc situados corriente abajo de la secuencia C1. Estas dos sondas han sido utilizadas para identificar, mediante la técnica de transferencia Northern, los ARN correspondientes aislados de las células ES normales de pollo. Tal como se ha mostrado en la figura 8A, estas dos sondas identifican un ARN de tamaño próximo a 4,5 kb, idéntico al del ARN mayoritario identificado anteriormente con la sonda C1. Tal como se muestra más adelante, el patrón de expresión de este ARN identificado con las sondas S1 y S2 es idéntico al del ARN mayoritario identificado con la sonda C1 en las células ES normales.

35 El conjunto de estos datos sugiere en gran medida que las sondas C1, S1 y S2 reconocen el mismo ARNm *ens-1* en las células ES normales de pollo.

40 La secuencia del ARNm *ens-1* está presentada en la SEC ID nº 1, y la estructura del ADNc está presentada en la figura 8B. El análisis de esta secuencia revela un marco de lectura de gran longitud que puede codificar para una proteína de 49 aminoácidos cuya secuencia esta representada por SEC ID nº 2. Se debe observar que la secuencia C1 es polimórfica y que la obtenida a partir del clon de ADNc, y representada en SEC ID nº 1, es ligeramente diferente de la obtenida anteriormente mediante 5'RACE (SEC ID nº 12).

Con el fin de verificar si el gen *ens-1* corresponde bien al gen en el que se inserta el transgén ROSA- $\beta$ -geo en las células 9N2.5, el patrón de expresión del gen *ens-1* durante el desarrollo embrionario del pollo y durante la diferenciación de las células ES de pollo en cultivo ha sido analizado utilizando la técnica de transferencia Northern.

45 Tal como se muestra en la figura 9, la sonda C1 y la sonda S1 identifican el mismo ARN de 4,5 kb en los ARN extraídos de embrión de pollo normal de 48 horas. La intensidad de la señal disminuye en gran medida en los ARN extraídos de embriones más mayores, tales como los embriones de 3 días y de 4 días. La señal desaparece en los ARN extraídos de embriones de 7 días o de 18 días de edad. Es nula en los ARN extraídos de diversos tejidos de polluelos tales como el hígado, el músculo, la molleja, el cerebro, el corazón, el ojo, el hueso o la piel.

50 Con el fin de determinar más precisamente el patrón de expresión del gen *ens-1* durante las primeras etapas del desarrollo del embrión de pollo, los ARNm *ens-1* han sido buscados mediante la técnica de hibridación *in situ* sobre el embrión total. Los resultados se presentan en la figura 10. Una señal muy fuerte fue observada en la zona pelúcida del embrión en las etapas X y XIII (escala E-G&K). En los embriones en la etapa 2 (escala H&H), la señal se encontró sólo en la zona pelúcida con una fuerte dominancia en la región de la línea primitiva. En la etapa 5 (escala H&H) la señal fue encontrada en el núcleo de Hensen y en la región rostro-caudal de la línea primitiva, así como en una forma muy pronunciada en el crecimiento germinal en posición anterior del embrión. En unas etapas más avanzadas del desarrollo embrionario, no se detectó ninguna señal significativa. Los mismos patrones de expresión fueron observados con las sondas C1 y S1.

55

Conclusión

El gen *ens-1* presenta una expresión específica de las células ES de pollo indiferenciadas y de las etapas muy precoces de la embriogénesis. La expresión del gen se vuelve más débil, incluso indetectable, después del final de la gastrulación.

5 El gen *ens-1* constituye por lo tanto un marcador muy específico de las células embrionarias indiferenciadas, ya estén presentes estas células en el embrión o ya sean mantenidas en este estado en cultivo *in vitro*. El gen *ens-1* es asimismo específico de las células del crecimiento germinal y por lo tanto de las células precursoras de los gametos.

**EJEMPLO 7: Conservación del gen *ens-1* durante la evolución**

10 Con el fin de analizar el grado de conservación del gen *ens-1* durante la evolución, se ha utilizado una sonda específica del gen *ens-1* de pollo para hibridar ADN genómico que procede de diversas especies animales mediante la técnica de transferencia Southern (no mostrado). Se ha utilizado asimismo la técnica de amplificación de secuencia nucleica por PCR entre dos cebadores específicos del gen *ens-1* (SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15), utilizando el protocolo: 96°C durante 3 minutos, (96°C durante 30 s, 62°C durante 30 s, 72°C durante 30 s, 10 ciclos), (96°C durante 30 s, 57°C durante 30 s, 72°C durante 30 s, 10 ciclos), (96°C durante 30 s, 52°C durante 30 s, 72°C durante 30 s, 20 ciclos). Los resultados presentados en la figura 11 muestran que unas secuencias homólogas se encuentran únicamente en el orden de las galliformes (pollo, codorniz, pavo, faisán, perdiz roja, perdiz gris). Se debe observar que no se encuentra ningún homólogo para *ens-1* en los mamíferos (no mostrado).

**EJEMPLO 8: Identificación en el gen *ens-1* de una secuencia promotora de transcripción cuya actividad es específica de las células cepas embrionarias**

20 El gen *ens-1* ha sido identificado por lo tanto como un gen específicamente expresado en las células cepas embrionarias de pollo.

25 Una región promotora cuya actividad transcripcional es específica de las células ES indiferenciadas de pollo ha sido identificada en el gen *ens-1*. Las aplicaciones son importantes porque esto permite disponer así de una herramienta genética que permitiría apuntar a la expresión de un transgén específicamente en las células cepas embrionarias y aparentemente asimismo en los embriones de pollo en la etapa anterior a la gastrulación.

30 La presencia de secuencias repetidas en los extremos del transcrito *ens-1* sugería que estas secuencias se parecían a las secuencias LTR (long terminal repeat) de los retrovirus. Las LTR de retrovirus están regionalizadas en tres partes, respectivamente U3, R y U5 (en el sentido 5'-3'). En el genoma retroviral, la región U3 es capaz de activar la transcripción a veces con un control tejido-específico. En los ARN mensajeros retrovirales, una copia de las secuencias R-U5 se encuentra en 5' y una copia de las secuencias U3-R se encuentra en 3'.

35 Por analogía con la estructura de las LTR de retrovirus, las regiones que pueden corresponder a las regiones U3, R y U5 de los retrovirus han sido identificadas en el ARN mensajero del gen *ens-1*. La secuencia identificada como repetida en los dos extremos del transcrito *ens-1* corresponde a la región R y la secuencia que correspondería a la región U3 se localiza entre el extremo 3' de la secuencia codificante para *ens-1* y el extremo 5' de R. (figura 12).

40 Para ensayar la actividad promotora de las regiones R y U3-R del gen *ens-1*, estas regiones han sido clonadas en las dos orientaciones posibles, sentido y antisentido, corriente arriba del gen informador de la luciferasa de lucioli para obtener respectivamente los vectores denominados promotor 1 y promotor 2, respectivamente sentido (S) y antisentido (AS). (figura 12). Estas construcciones han sido transfectadas en diferentes líneas celulares, incluyendo unas células cepas de pollo 9N2.5, con, como control interno de eficacia de transfección, el vector pRL-CMV (Promega) que contiene el gen de luciferasa de la oruga Renilla bajo el control del promotor de citomegalovirus.

45 La transfección de los diversos vectores promotor 1 y promotor 2 en las células 9N2.5 y la medición de la actividad luciferasa normalizada gracias al control interno han permitido identificar una actividad transcripcional de la región U3 del vector promotor 2S en las células cepas embrionarias de pollo (células 9N2.5) mientras que la región R no muestra ninguna actividad significativa (figura 13). La actividad del promotor es por el contrario muy baja en las otras líneas diferentes celulares ensayadas (fibroblastos de perdiz Qt6, células epiteliales de perdiz QBr o células epiteliales humanas). Por un lado, el vector promotor 2S ha sido transfectado en unas células cepas embrionarias 9N2-5 inducidas a diferenciarse mediante tratamiento con ácido retinoico. La medición de la actividad luciferasa en las células a diferentes tiempos después del tratamiento por el ácido retinoico muestra que la actividad transcripcional del promotor decrece durante la diferenciación de las células cepas embrionarias mientras que la actividad del promotor de control (CMV) sigue siendo fuerte. (figura 14).

50 El conjunto de estos resultados muestra que existe, en dirección 3' de la secuencia codificante del gen *ens1*, una región dotada de una actividad promotora de la transcripción y que esta actividad transcripcional es específica de las células cepas embrionarias de pollo indiferenciadas.

55 Utilizando la técnica 5'RACE sobre el vector promotor 2S, ha sido posible determinar un sitio iniciador de transcripción sobre la secuencia del ADNc *ens-1* (SEC ID nº 1), así como una secuencia de tipo promotor TATA corriente arriba de este sitio iniciador de la transcripción. El promotor corresponde a los nucleótidos 3111-3670 de SEC ID nº 1.

## DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

La línea celular 9N2.5 ha sido depositada el 11 de mayo de 2000 en la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de orden I-2477, y corresponde a la línea de células cepas embrionarias de pollo en la que el transgén ROSA- $\beta$ -geo linealizado por *Dral* ha sido introducido mediante electroporación, y que fueron aisladas después de la selección con G418, y para su actividad  $\beta$ -galactosidasa, tal como se ha descrito en el ejemplo 1.

Las células que se pueden utilizar para cultivar las células 9N2.5 (fibroblastos de ratón, STO) han sido depositadas asimismo a la CNCM el 11 de mayo de 2000, con el número SH-2477.

## Referencias

- 10 Buckholz, (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 538.  
 Carter, (1993) *Curr. Op. Biotechnology* 3, 533.  
 Duck *et al.* (1990), *Biotechniques*, 9, 142.  
 Edwards y Aruffo (1993), *Curr. Op. Biotechnology*, 4, 558.  
 Epstein (1992) *Médecine/Sciences*, 8, 902.
- 15 Etches *et al.* (1996). *Science* 76, 1075-1083.  
 Eyal-Giladi y Kovak (1976). *Dev. Biol.* 151, 75-585.  
 Freidrich y Soriano (1991). *Genes & Development* 5, 1513-1523.  
 Guatelli *et al.* (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874.  
 Kemler *et al.* (1981). *J. Embryol. Exp. Morph.* 64, 45-60.
- 20 Kievitis *et al.* (1991), *J. Virol. Methods*, 35, 273.  
 Köhler y Milstein. (1975) *Nature* 256, 495.  
 Kwoh, *et al.* (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1173.  
 Landegren *et al.* (1988) *Science* 241, 1077.  
 Luckow (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 564.
- 25 Matsui *et al.* (1992). *Cell* 70, 841-847.  
 Matthews *et al.* (1988), *Anal. Biochem.*, 169, 1-25.  
 Miele *et al.* (1983), *J. Mol. Biol.*, 171, 281.  
 Neddleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443  
 Olins y Lee (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4: 520.
- 30 Pain *et al.* (1996). *Development* 122, 2339-2348.  
 Pain *et al.* (1999). *Cells Tissues Organes* 165, 212-219.  
 Perricaudet *et al.* (1992). *La Recherche* 23: 471.  
 Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444  
 Prowse y Greider (1995). *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4818-4822.
- 35 Rohlmann *et al.* (1996) *Nature Biotech.* 14: 1562.  
 Rolfs, A. *et al.* (1991), Berlin: Springer-Verlag.  
 Rosner *et al.* (1990). *Nature* 354, 686-692.  
 Sambrook *et al.* (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York.
- 40 Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, Nueva York, 197-205.  
 Shamlott *et al.* (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13726-13731.

Smith y Waterman (1981) Ad. App. Math. 2: 482

Solter y Knowles (1978) Proc Natl Acad Sci USA. 75, 5565-5569.

Stewart y Yound (1984), Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2<sup>a</sup> ed., (1984).

Strickland *et al.* (1980). Cell 21, 347-355.

5

Temin, (1986) Retrovirus vectors for gene transfer. En Kucherlapati R., ed. Gene Transfer, Nueva York, Plenum Press, 149-187.

Walker (1992), Nucleic Acids Res. 20: 1691.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS ÉCOLE NORMAL SUPÉRIEURE DE LYON - ENS LYON

5

<120> CÉLULAS ES MODIFICADAS Y GEN ESPEÍFICO DE CÉLULAS ES.

<130> D18898

10

<150> FR 00 06029

<151> 11/05/2000

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 4177

<212> ADN

<213> Pollo

20

<220>

<221> CDS

<222> (1409)..(2881)

25

<400> 1

# ES 2 358 731 T3

cgacagactt gaggggttct ctgccaactg atctctcacc gcaatgggta gacggatctc 60  
tactgtgaga ctgatctctc accacgacac gagcttctctg ccttcogate ctctctacg 120  
gaccgtttgc tgacggactt ccctgggcct gctacctgag acctgctgct tctctcctga 180  
cctgcatctc ctgctgccc cagaccggcc togtgtctcc tgcccttcgg cctcggaccg 240  
tcggaacatc gtgcaacggg actgctgccc gatcctgggtg gtgactatcc ccgctttacg 300  
caattcttgc ctctttctat cttttctatc gctcgccttc ccttccocat caccocaatc 360  
cttaatagcg tccgtectcc cctttcccca tctccttat taacatttgt aataaactgg 420  
tcggaccaac atttgaacgg ctgtttctta atctcagcc gggcatacat atttcaaaga 480  
acctcttctc cctcctataa attggagcga gacatctttt atggcgtagt cggcaggata 540  
ccgcgcgtga gagtgttgc cttcagata atagtctgaa actttctgcg tgtacctcct 600  
ggagtgtcaa gaagcgatac ttcttgataa cttagacgtg agcacctctc caggaagatc 660  
gcttcatact ctgaaacttt actatttatg tgtgtacctc tcgaggatgt atgaattttg 720  
tctaattgta tttatttaat acgtgtgtgc ctctcggga agacctctct gcattttgtg 780  
aaccctctc tacgtgtgcg cctcttgggg aagcaagata cacgtttttt gacttaaaaa 840  
acttgtgtgc ctccaagaa gttttctcac tttgctgaaa attgtttatg tatgcacctc 900  
tcgaggacgt atgaatcttg tctaattgca ttaatacgt gtgtgcctcc tcgggaagac 960  
ctctctgcat tttgtgactt aaggatcttg caacttaagt gtgaaatttg aacctcttc 1020



ES 2 358 731 T3

Glu Tyr Thr Phe Asp Asn Ser Glu Asn Leu Asp Pro Gln Met Asn Val 185 190 195 200	
aag gaa att ccc ttt tgc gcc act gaa ctg gcc aaa ctg aaa aag gat Lys Glu Ile Pro Phe Ser Ala Thr Glu Leu Ala Lys Leu Lys Lys Asp 205 210 215	2056
ttc agt cgc tcc cca aag gag tct gaa aca gag tac gtc tgg aga gtt Phe Ser Arg Ser Pro Lys Glu Ser Glu Thr Glu Tyr Val Trp Arg Val 220 225 230	2104
agt ctc act ggc gga gac cag atc cta cta aca gag aaa gaa gct gaa Ser Leu Thr Gly Gly Asp Gln Ile Leu Leu Thr Glu Lys Glu Ala Glu 235 240 245	2152
ggt tac tgg gga cca gga gta ttt tta acc act ggc aat aat cgt gct Gly Tyr Trp Gly Pro Gly Val Phe Leu Thr Thr Gly Asn Asn Arg Ala 250 255 260	2200
ccc tgg tcc tta aca cag agg gct gcc tat tgg gca ggg ggt ctc aac Pro Trp Ser Leu Thr Gln Arg Ala Ala Tyr Trp Ala Gly Gly Leu Asn 265 270 275 280	2248
cct tta gaa agg ggg gac cct ctt gct att act gga act atc gac cag Pro Leu Glu Arg Gly Asp Pro Leu Ala Ile Thr Gly Thr Ile Asp Gln 285 290 295	2296
tta gtg gag aat gtt cag aaa gct gct tgt ctc caa atg atg tat gat Leu Val Glu Asn Val Gln Lys Ala Ala Cys Leu Gln Met Met Tyr Asp 300 305 310	2344
aga aag ttg cag cca cat aat gaa tca ccc atg atg tta cct gtt aat Arg Lys Leu Gln Pro His Asn Glu Ser Pro Met Met Leu Pro Val Asn 315 320 325	2392
cog gag aga ctg aca cct cta atc agg gga ctt cct gaa tgc tta aaa Pro Glu Arg Leu Thr Pro Leu Ile Arg Gly Leu Pro Glu Ser Leu Lys 330 335 340	2440
cct ata ggt ata caa ctc caa gga aag ata caa gcc atg tct cag gga Pro Ile Gly Ile Gln Leu Gln Gly Lys Ile Gln Ala Met Ser Gln Gly 345 350 355 360	2488
gag aga acc tgg gca gcg ttg gag gga tct gta gcc cct aac cac cag Glu Arg Thr Trp Ala Ala Leu Glu Gly Ser Val Ala Pro Asn His Gln 365 370 375	2536
tca gga ccc aaa gtg tgg act tgg gga gag gtt gcc caa gaa tta att Ser Gly Pro Lys Val Trp Thr Trp Gly Glu Val Ala Gln Glu Leu Ile 380 385 390	2584
aac tat gga aga aaa tat ggg ccg gtg gtt tot acc tgc agt aaa ttt Asn Tyr Gly Arg Lys Tyr Gly Pro Val Val Ser Thr Cys Ser Lys Phe 395 400 405	2632
gag cca aga gga gta agg ctt gca gta gcc agc ctt gcc tcc agg cct Glu Pro Arg Gly Val Arg Leu Ala Val Ala Ser Leu Ala Ser Arg Pro 410 415 420	2680
cct agc cca aga ctt att gga acc aaa aag gtt tca tcc cca gta aaa Pro Ser Pro Arg Leu Ile Gly Thr Lys Lys Val Ser Ser Pro Val Lys	2728

ES 2 358 731 T3

```

425                430                435                440
acg ggg aca cga tgc att gat cat aaa cgc aat gga ctt tgg acn ctg 2776
Thr Gly Thr Arg Cys Ile Asp His Lys Arg Asn Gly Leu Trp Xaa Leu
                445                450                455

ggc tgg .aca aag ggt att cca cga gat ttg atg aat gga tta ccc aca 2824
Gly Trp Thr Lys Gly Ile Pro Arg Asp Leu Met Asn Gly Leu Pro Thr
                460                465                470

gtc aga tta gag aaa tta gtt aac tgc tgg cca gaa caa aag ctc aag 2872
Val Arg Leu Glu Lys Leu Val Asn Cys Trp Pro Glu Gln Lys Leu Lys
                475                480                485

ggg agc tga tgccttcgcc cccccctccc aggtgagcgg gaggtgggtg          2921
Gly Ser
                490

ggggggtgaa ggggtgatgt ttattaggaa gctcaccgact aaaggaaaca atctgttaat 2981
tgtttattta ttattagtgg ttattgtcaa atgtaccggtt gtctcttttc tctcttctat 3041
tcattatgta arattcatgt taccactcct gaagaatcac ggggtggtgt ctatggcaag 3101
ttgcattgtg tactgttgca actcttatgt ttgtatgatt ccatgtttta tacaagatgt 3161
tgtatcccct atttactttg taaccaaacc tgaaaaatgt ttgtaatgat tgtatgaaac 3221
atltgattcc acaaceccctc cctcctttac ccttgtgctt getatcttct ctcaccacca 3281
tggatgccca gtgtccaatt ttaagcaac ctttgagtca cggggtgggtg taagagacta 3341
ttcttttata tcattgactc aaagtttget gaggaacaag tccaggcaag tcctgggcaa 3401
aggcagagaa atcttttgtc ttgaggacac tgatggacag gtcctggcta aggattgtga 3461
aatcctttaa ggagcacaga tggacaaggc caggggcac c gagagagaga taagtgccg 3521
ctaattggccg ggaacggtc tttttgtgtg gacttatctc aaggaaaatg gccatctcag 3581
gaggtatgca caggactctt gctcaagccc ccaggaatgt cacgtaggca gcagaaaatg 3641
gaggataaaa gaggtccaat aaccacaacg gtggaagctg atccttcacc acaaccacgg 3701
caacgggaga ngcttatctc tcaccacgac agacttgagg ggttctctgc caactgatct 3761
ctcaccgcaa tgggtagacg gatctctacg tggagactga tctctacca cgacacgagc 3821
ttcctgcctt ccgatcctcc tctaoggacc gtttgetgat ggacttcctt gggcctgeta 3881
cctgagacct gctgcttctt cctgacctg catctctctg ctgcccaga ccggcctcgc 3941
tgetcctgcc cttecgctcg aacatcgtgc aacgggactg ctgccggatc ctgglggtga 4001
ctatccccgc ttaacgcaat tctngcctct ttctatcttt tnatcgctc gccttccctt 4061
ccccatcacc ccaatcctta atagcgtcg tcctccccct tccccatctc ccttattaac 4121
atltgtaata aactggtcg accaacaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaa          4177

```

<210> 2

5

<211> 490

<212> PRT

<213> Pollo

<400> 2

ES 2 358 731 T3

Met Ser Asn Ser Met Ala Ser Met Lys Ser Glu Asp Val Leu Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Glu Lys His Gly Ala Arg Pro Ser Val Ser Gly Val Asp Trp  
 20 25 30  
 Ala Arg Gln Asn Trp Tyr Asn Leu Gln Ser Val Ser Asp Arg Ile Arg  
 35 40 45  
 Val Leu Gln Asn Glu Ala Arg Thr Arg Ala Gly Lys Gly Lys Ser Phe  
 50 55 60  
 Ile Cys Ala Val Leu Gly Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Glu Phe Arg  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Lys Asn Ser Thr Glu Thr Gln Ser Ile Gln Ala Leu Gln Glu  
 85 90 95  
 Ser Val Lys Val Thr Gln Glu Leu Val Lys Ser Leu Gln Ser Gln Ile  
 100 105 110  
 Arg Ser Leu Glu Asp Gln Leu Glu Arg Glu Lys His Asn Ser Val Leu  
 115 120 125  
 Leu Gln Thr Ala Phe Lys Glu Leu Ile Thr Cys Lys Asp Thr Gly Asp  
 130 135 140  
 Thr Val Ile His Ser Ala Pro Gln Glu Lys Val Tyr Pro Gln Gly Lys  
 145 150 155 160  
 Leu Gln Glu Val Lys Glu Arg Leu Asp Lys Leu Glu Ala Ser Pro Ala  
 165 170 175  
 His Ile Arg Pro Leu Ile Lys Thr Glu Tyr Thr Phe Asp Asn Ser Glu  
 180 185 190  
 Asn Leu Asp Pro Gln Met Asn Val Lys Glu Ile Pro Phe Ser Ala Thr  
 195 200 205  
 Glu Leu Ala Lys Leu Lys Lys Asp Phe Ser Arg Ser Pro Lys Glu Ser  
 210 215 220  
 Glu Thr Glu Tyr Val Trp Arg Val Ser Leu Thr Gly Gly Asp Gln Ile  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Thr Glu Lys Glu Ala Glu Gly Tyr Trp Gly Pro Gly Val Phe  
 245 250 255  
 Leu Thr Thr Gly Asn Asn Arg Ala Pro Trp Ser Leu Thr Gln Arg Ala  
 260 265 270  
 Ala Tyr Trp Ala Gly Gly Leu Asn Pro Leu Glu Arg Gly Asp Pro Leu  
 275 280 285  
 Ala Ile Thr Gly Thr Ile Asp Gln Leu Val Glu Asn Val Gln Lys Ala  
 290 295 300  
 Ala Cys Leu Gln Met Met Tyr Asp Arg Lys Leu Gln Pro His Asn Glu  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Met Met Leu Pro Val Asn Pro Glu Arg Leu Thr Pro Leu Ile  
 325 330 335  
 Arg Gly Leu Pro Glu Ser Leu Lys Pro Ile Gly Ile Gln Leu Gln Gly  
 340 345 350  
 Lys Ile Gln Ala Met Ser Gln Gly Glu Arg Thr Trp Ala Ala Leu Glu  
 355 360 365  
 Gly Ser Val Ala Pro Asn His Gln Ser Gly Pro Lys Val Trp Thr Trp  
 370 375 380  
 Gly Glu Val Ala Gln Glu Leu Ile Asn Tyr Gly Arg Lys Tyr Gly Pro  
 385 390 395 400  
 Val Val Ser Thr Cys Ser Lys Phe Glu Pro Arg Gly Val Arg Leu Ala  
 405 410 415  
 Val Ala Ser Leu Ala Ser Arg Pro Pro Ser Pro Arg Leu Ile Gly Thr  
 420 425 430  
 Lys Lys Val Ser Ser Pro Val Lys Thr Gly Thr Arg Cys Ile Asp His  
 435 440 445  
 Lys Arg Asn Gly Leu Trp Xaa Leu Gly Trp Thr Lys Gly Ile Pro Arg  
 450 455 460  
 Asp Leu Met Asn Gly Leu Pro Thr Val Arg Leu Glu Lys Leu Val Asn  
 465 470 475 480  
 Cys Trp Pro Glu Gln Lys Leu Lys Gly Ser  
 485 490

<210> 3

<211> 22

5

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>  
 <223> Gen LacZ.

<400> 3

5  
 tggagtgcgc gcagttatct gg 22

<210> 4  
 <211> 22  
 10 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

<220>  
 <223> Gen LacZ.

15  
 <400> 4

ggcttcatcc accacataca gg 22

20 <210> 5  
 <211>25  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

25 <220>  
 <223> Gen LacZ.

<400> 5

30 ccgtgcatct gccagttga gggga 25

<210> 6  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Adaptador cebador sintético.

	<400> 6	
5	ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc aggt	44
	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 7	
15	ccatcctaatacgcgactcact atagggc	27
	<210> 8	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
	<223> Gen LacZ.	
25	<400> 8	
	gggatccgcc atgtcacaga	20
30	<210> 9	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Pollo	
35	<220>	
	<223> Cebador.	
	<400> 9	

actatcgatt ctggaacctt cagaggtttt tttttttt tttt

44

5

- <210> 10
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Pollo

10

- <220>
- <223> Cebador.

<400> 10

15

gtcgtgcaac gggactgcct g

21

- <210> 11
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Pollo

20

- <220>
- <223> Cebador.

<400> 11

25

ctatcgattc tggaaacctt agagg

25

- <210> 12
- <211> 171
- <212> ADN
- <213> Pollo

30

<400> 12

35

tccttctcta cggaccgttt gctgacggac ttccctgggc ctgctacctg agacctgctg 60  
 cttectccct gacctgcacc ctctcgttgc ccaagaccgg cctcaactgt cctgcccttc 120  
 ggctcggac catcggaacg tcgtgcaacg ggactgctgc tgaatcctgg t 171

<210> 13

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Pollo	
5	<220>	
	<223> Cebador.	
	<400> 13	
10	agaccggcct cactgctc	18
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Pollo	
	<220>	
	<223> Cebador ens1 S1	
20	<400> 14	
	ggatctagat cctcaaatga a	21
	<210> 15	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Pollo	
	<220>	
30	<223> Cebador ens1 AS1	
	<400> 15	
	aattcttggg caacctctc	19
35		

## REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico purificado o aislado, caracterizado porque comprende una secuencia nucleica seleccionada de entre el grupo de secuencias siguientes:
- 5 a) SEC ID nº 1, o el fragmento nucleotídico 1409-2878 de SEC ID nº 1;
- b) el fragmento nucleotídico 3111-3670 de SEC ID nº 1;
- c) una secuencia nucleica que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, después de la alineación óptima con una secuencia definida en a) o en b) que desempeña una función en el carácter de pluripotencia de las células ES y que se puede utilizar como marcador del carácter de pluripotencia de las células ES;
- 10 d) la secuencia complementaria o la secuencia de ARN procedente de la secuencia tal como la definida en a), b) o c).
2. Ácido nucleico purificado o aislado según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende o está constituido por la SEC ID nº 1, la secuencia complementaria o la secuencia de ARN procedente de una de estas secuencias.
- 15 3. Ácido nucleico purificado o aislado, caracterizado porque codifica para un polipéptido que posee un fragmento continuo de por lo menos 200 aminoácidos de la proteína SEC ID nº 2.
4. Polipéptido aislado, caracterizado porque comprende un polipéptido seleccionado de entre:
- a) un polipéptido de secuencia SEC ID nº 2,
- 20 b) un polipéptido que comprende por lo menos 80% de identidad con dicho polipéptido de a), que desempeña una función en el carácter de pluripotencia de las células ES y que se puede utilizar como marcador del carácter de pluripotencia de las células ES.
5. Polipéptido según la reivindicación 4, caracterizado porque está constituido por una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 2, o una secuencia que posee por lo menos 80% de identidad con esta secuencia después de la alineación óptima.
- 25 6. Vector de clonación y/o de expresión que comprende un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, o que codifica para un polipéptido según una de las reivindicaciones 4 y 5.
7. Célula hospedante, con la excepción de las células ES humanas, caracterizada porque se transforma mediante un vector según la reivindicación 6.
- 30 8. Célula hospedante, que contiene un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque se trata de una célula ES de pájaro modificada además mediante la introducción de un gen exógeno, estando dicho gen exógeno integrado en dicho ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, y siendo único y específicamente expresado cuando dicha célula se mantiene en el estado pluripotente.
9. Célula según la reivindicación 8, caracterizada porque dicho gen exógeno es un gen informador.
- 35 10. Célula según la reivindicación 9, caracterizada porque dicho gen informador se selecciona de entre lacZ, GFP, luciferasa, ROSA-β-geo, y un gen de resistencia a un antibiótico.
11. Célula hospedante que contiene un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque se trata de una célula de pájaro modificada además mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno, estando dicho ácido nucleico exógeno integrado en dicho ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 40 12. Célula según la reivindicación 11, caracterizada porque dicho ácido nucleico exógeno es un gen de interés terapéutico, eventualmente precedido de un promotor espacio-temporal y/o de secuencias de terminación.
13. Célula según la reivindicación 11, caracterizada porque dicho ácido nucleico exógeno es un marcador genético.
14. Célula según una de las reivindicaciones 8 a 13, caracterizada porque dicho pájaro pertenece al orden de las galliformes.
- 45 15. Célula según la reivindicación 14, caracterizada porque dicho pájaro es un pollo o una codorniz.
16. Célula según una de las reivindicaciones 14 y 15, caracterizada porque dicho gen informador está integrado bajo el control del promotor del gen *ens-1* de secuencia nucleotídica 3111-3670 de SEC ID nº 1.
17. Célula según una de las reivindicaciones 14 y 15, caracterizada porque se trata de una célula 9N2.5, depositada en la Collection Nationale des Microorganismes el 11 de mayo de 2000 con el número de orden 1-2477.

18. Célula de pájaro diferenciada, caracterizada porque se deriva de una célula ES según una de las reivindicaciones 8 a 17.
19. Animal, salvo el ser humano, caracterizado porque comprende una célula según una de las reivindicaciones 7 a 18.
- 5 20. Utilización de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre una secuencia de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1, y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias, como sonda o cebador, para la detección y/o la amplificación de secuencias de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 21. Utilización de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1, y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias, como oligonucleótido sentido o antisentido específico de una secuencia de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 22. Utilización de una secuencia de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, para la producción de un polipéptido recombinante según la reivindicación 4 ó 5.
23. Procedimiento de obtención de un polipéptido recombinante, caracterizado porque se cultiva una célula según la reivindicación 7 en unas condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido y porque se recupera dicho polipéptido recombinante, siendo dicho polipéptido el polipéptido según la reivindicación 4 ó 5.
- 20 24. Polipéptido recombinante, caracterizado porque se obtiene mediante un procedimiento según la reivindicación 23.
- 25 25. Anticuerpo monoclonal o policlonal, caracterizado porque une selectivamente un polipéptido según una de las reivindicaciones 4, 5 ó 24.
26. Procedimiento de detección de un polipéptido según una de las reivindicaciones 4, 5 ó 24, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- a) poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo según la reivindicación 25;
- b) demostrar el complejo antígeno-anticuerpo formado.
27. Kit de agentes reactivos para la realización de un procedimiento según la reivindicación 26, caracterizado porque comprende:
- 30 a) un anticuerpo monoclonal o policlonal según la reivindicación 25;
- b) eventualmente unos agentes reactivos para la constitución de un medio propicio para la reacción inmunológica;
- c) los agentes reactivos que permiten la detección del complejo antígeno-anticuerpo producido durante la reacción inmunológica.
- 35 28. Procedimiento de determinación del carácter pluripotente de una célula ES de pájaro, caracterizado porque se determina la presencia de un producto de expresión del gen de secuencia SEC ID nº 1, o del ARNm de SEC ID nº 1.
29. Procedimiento según la reivindicación 28, caracterizado porque la detección del ARNm de SEC ID nº 1 se efectúa mediante transferencia Northern o mediante RT-PCR utilizando una sonda o unos cebadores, para una utilización según la reivindicación 20.
- 40 30. Procedimiento según la reivindicación 28, caracterizado porque se detecta la presencia de la proteína SEC ID nº 2, utilizando por ejemplo un anticuerpo según la reivindicación 25.
- 45 31. Procedimiento de clasificación de la pertenencia de un pájaro al orden de las galliformes, caracterizado porque se detecta, en el genoma de dicho pájaro, la presencia de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias.
- 50 32. Procedimiento de determinación de la presencia de una muestra que procede de un pájaro del orden de las galliformes en una muestra alimenticia, caracterizado porque se detecta, en dicha muestra, la presencia de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias.
33. Chip de ADN, caracterizado porque contiene una secuencia nucleica según una de las reivindicaciones 1

a 3.

34. Chip de proteínas, caracterizado porque contiene un polipéptido según una de las reivindicaciones 4, 5 ó 24, o un anticuerpo según la reivindicación 25.

5 35. Procedimiento de detección y/o de dosificación de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, en una muestra biológica o alimenticia, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

10 a) poner en contacto dicha muestra con una secuencia de ácido nucleico marcada seleccionada de entre un polinucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 3, un fragmento de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y una secuencia nucleica que se hibrida en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias;

b) detectar y/o dosificar el híbrido formado entre dicho polinucleótido y el ácido nucleico de dicha muestra.

15 36. Procedimiento de detección y/o de dosificación de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3, en una muestra biológica o alimenticia, caracterizado porque comprende una etapa de amplificación de los ácidos nucleicos de dicha muestra con la ayuda de cebadores seleccionados de entre los ácidos nucleicos según una de las reivindicaciones 1 a 2, los fragmentos de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia SEC ID nº 1 y las secuencias nucleicas que se hibridan en unas condiciones de fuerte astringencia con una de estas secuencias.

37. Procedimiento de cribado de una sustancia o de un medio capaces de inducir una diferenciación de las células pluripotentes, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

20 a) mantener células ES, con la excepción de las células ES humanas, según una de las reivindicaciones 7 a 17 en un medio de cultivo que permite el mantenimiento del fenotipo pluripotente;

b) añadir dicha sustancia en dicho medio de cultivo o sustituir dicho medio de cultivo por el medio a ensayar;

c) determinar la inducción de la diferenciación mediante la ausencia de expresión de la proteína SEC ID nº 2 o del gen exógeno.

25 38. Procedimiento según la reivindicación 37, caracterizado porque se efectúa con unas células según una de las reivindicaciones 8 a 17.

39. Procedimiento según la reivindicación 37 ó 38, caracterizado porque se utilizan unas células 9N2.5 y porque se detecta la ausencia de expresión de la  $\beta$ -galactosidasa.

30 40. Procedimiento de cribado de una sustancia capaz de restaurar el carácter pluripotente de células diferenciadas que se derivan de células según una de las reivindicaciones 8 a 17, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

a) mantener células diferenciadas que se derivan de células según una de las reivindicaciones 8 a 17 en un medio de cultivo adecuado;

35 b) sustituir dicho medio de cultivo por un medio que permite mantener un fenotipo pluripotente, y que contiene dicha sustancia a ensayar;

c) determinar la restauración del carácter pluripotente de dichas células mediante la expresión de la proteína SEC ID nº 2 o del gen exógeno, en dichas células.

41. Procedimiento según la reivindicación 40, caracterizado porque se utilizan unas células 9N2.5 diferenciadas, y porque se detecta la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa.

40 42. Compuesto caracterizado porque se selecciona de entre:

a) un ácido nucleico según una de las reivindicaciones 1 a 3;

b) un polipéptido según una de las reivindicaciones 4, 5 ó 24;

c) un vector según la reivindicación 6;

d) una célula según una de las reivindicaciones 7 a 17;

45 e) un anticuerpo según la reivindicación 25,

a título de medicamento.

43. Utilización de la secuencia nucleotídica 3111-3670 de SEC ID nº 1 como promotor de un gen de interés para una expresión específica de dicho gen de interés en unas células pluripotentes aviares.

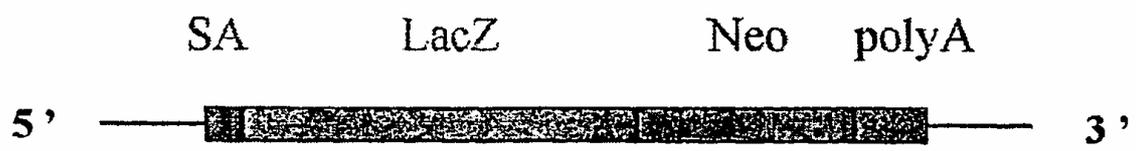


FIG.1

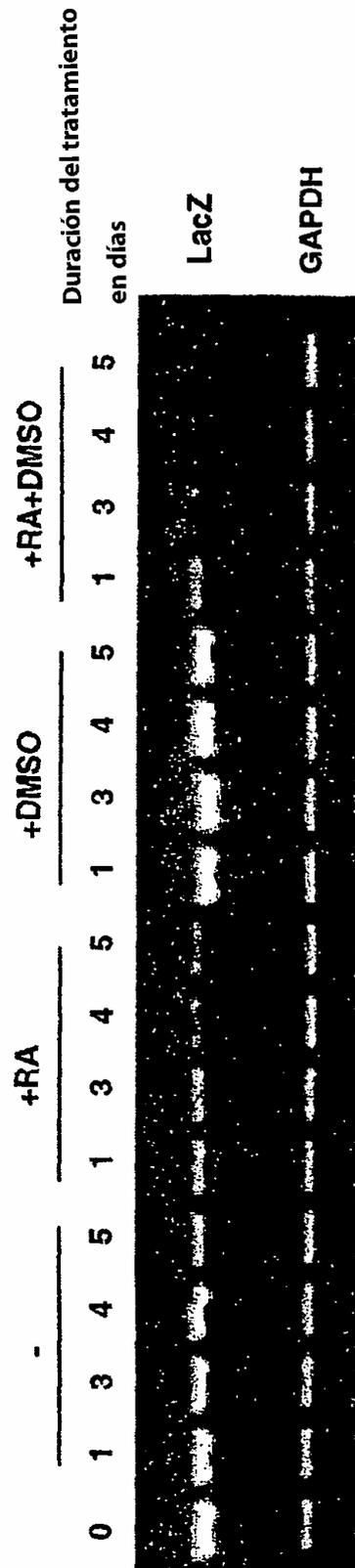


FIG.2

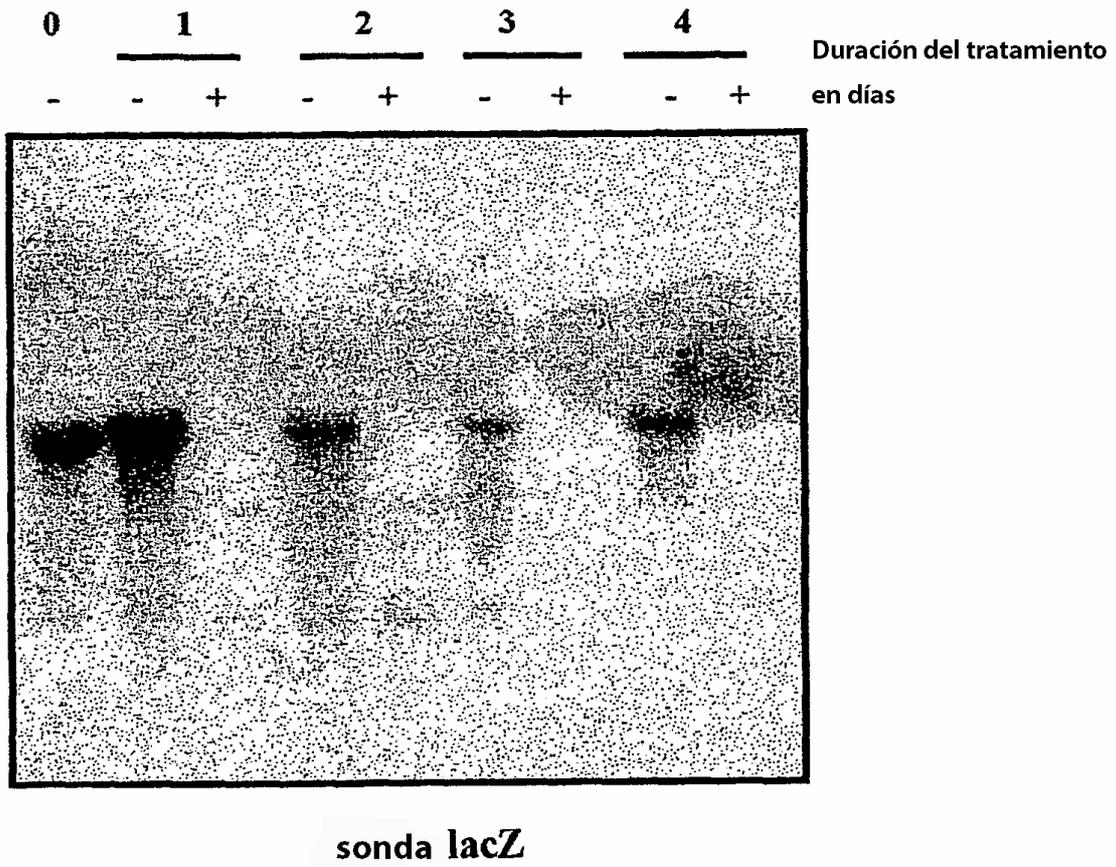
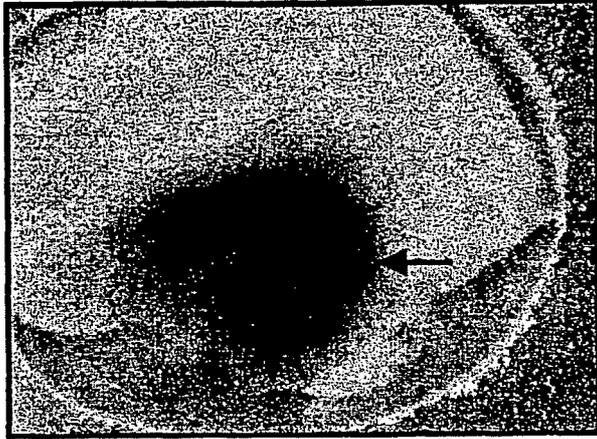
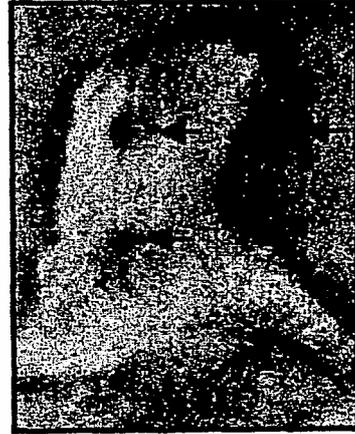


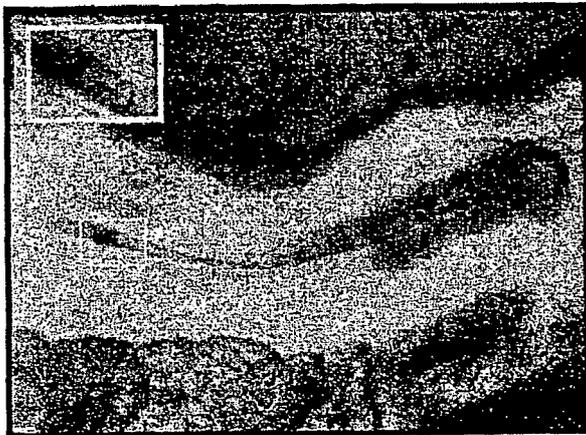
FIG.3



periodo XIII



periodo 5



periodo 13

FIG.4

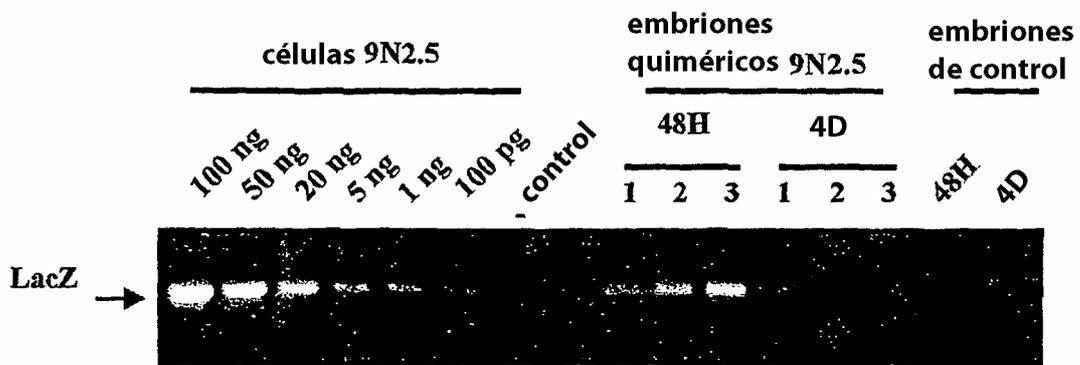


FIG.5

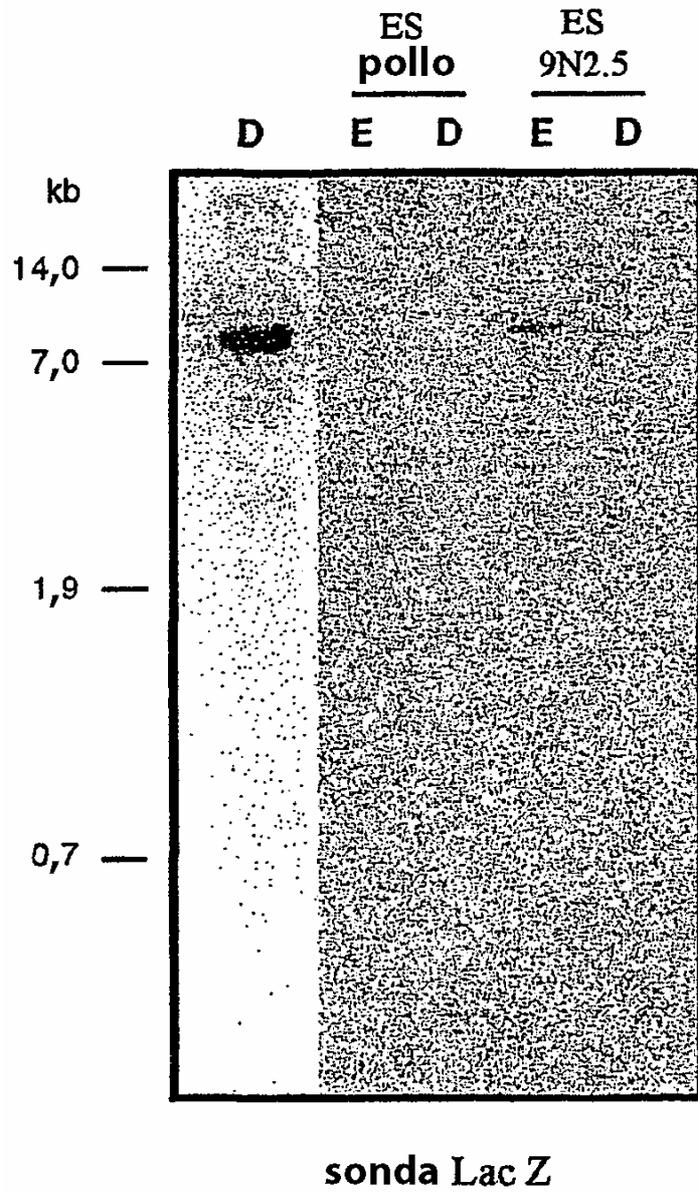
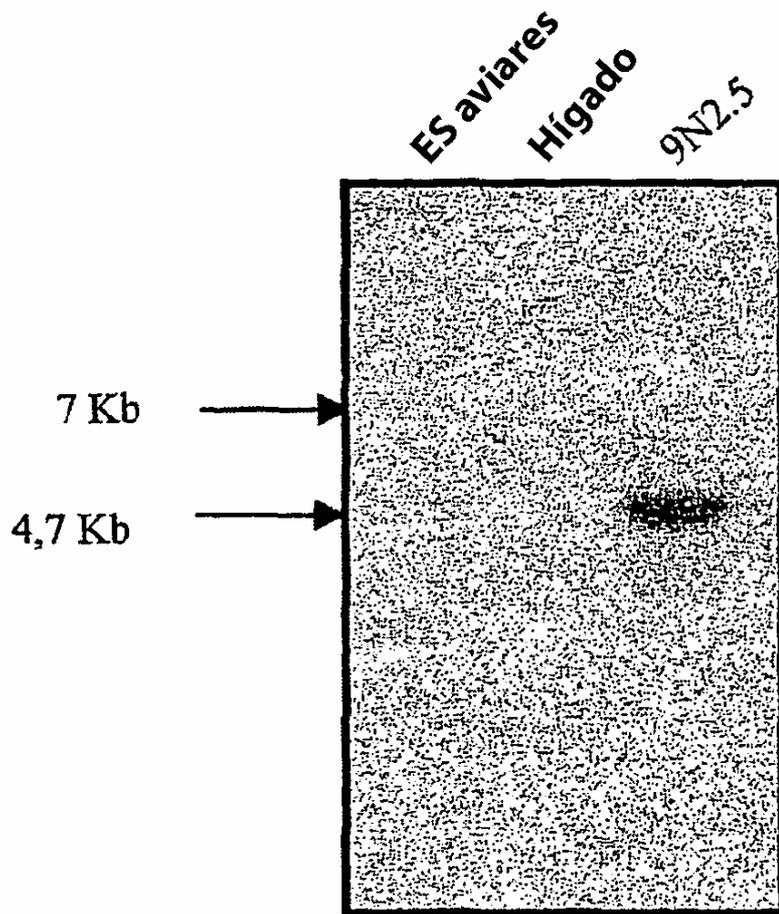


FIG.6



Hibridación con una sonda LacZ

FIG.7

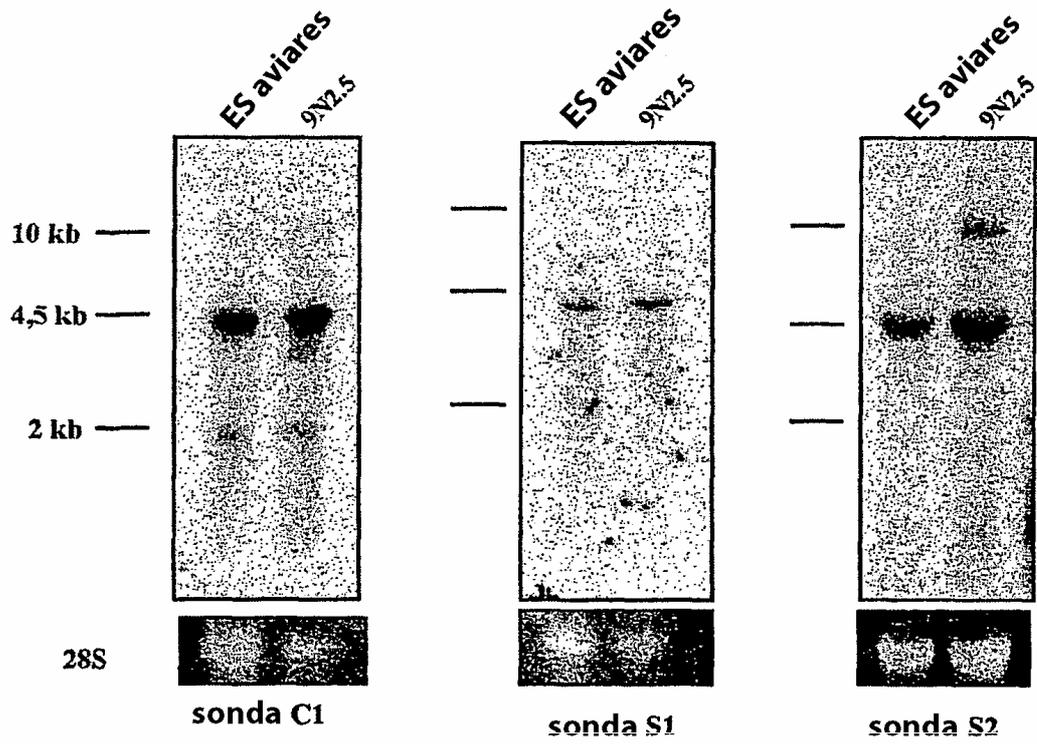


FIG.8A

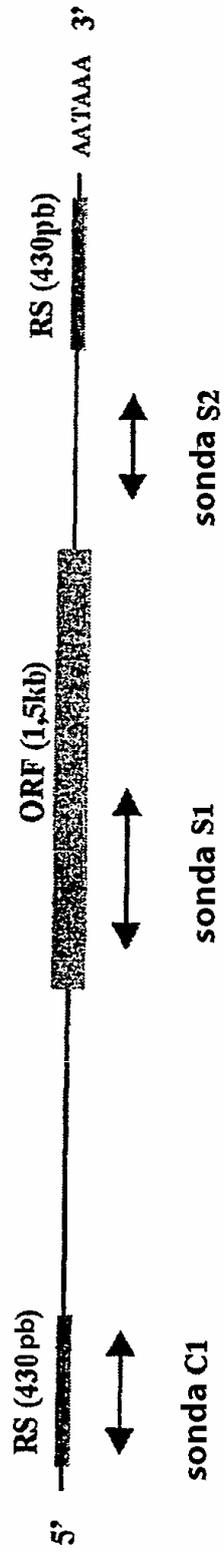


FIG.8B

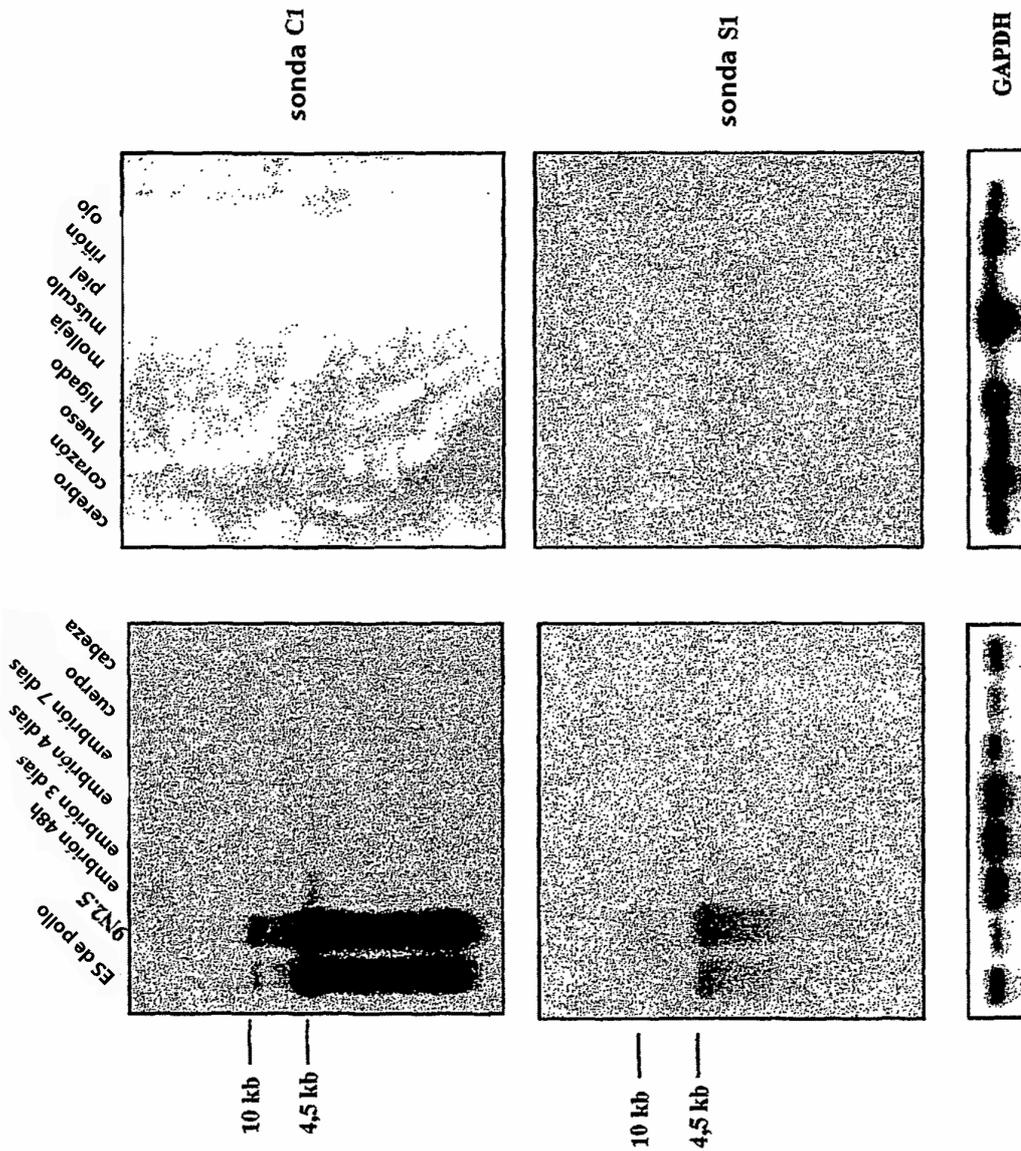
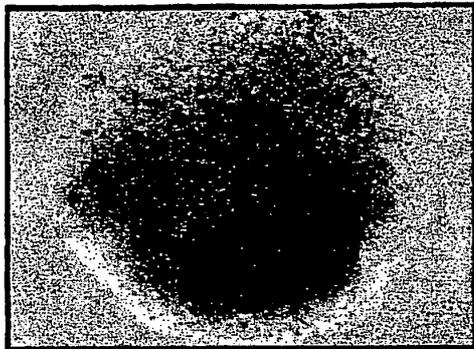
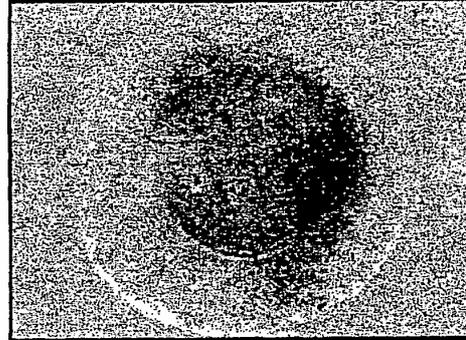


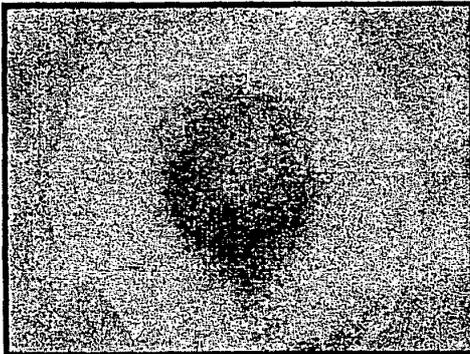
FIG. 9



periodo X  
cara superior



periodo XIII  
cara superior



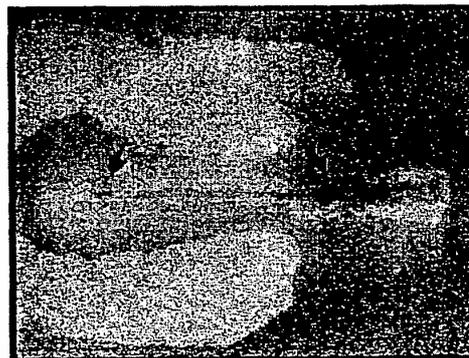
periodo 2  
cara superior



periodo 5  
gastrulación



periodo 10



periodo 12

FIG.10

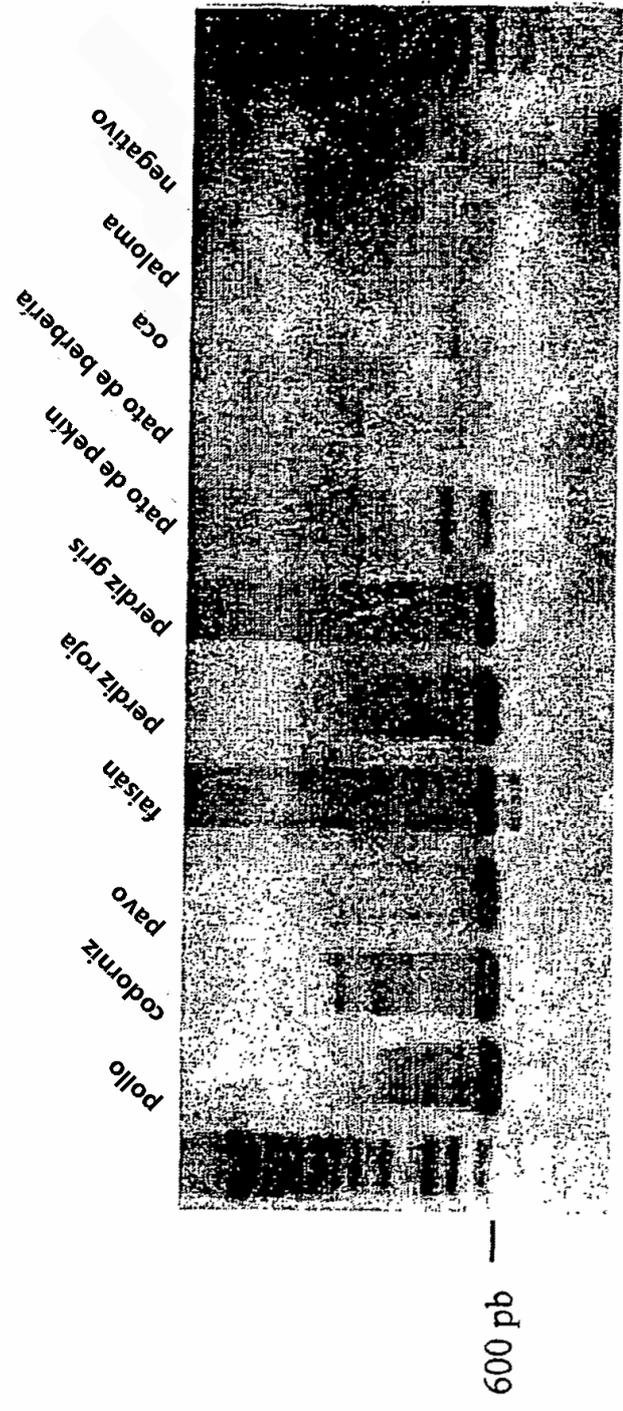


FIG.11

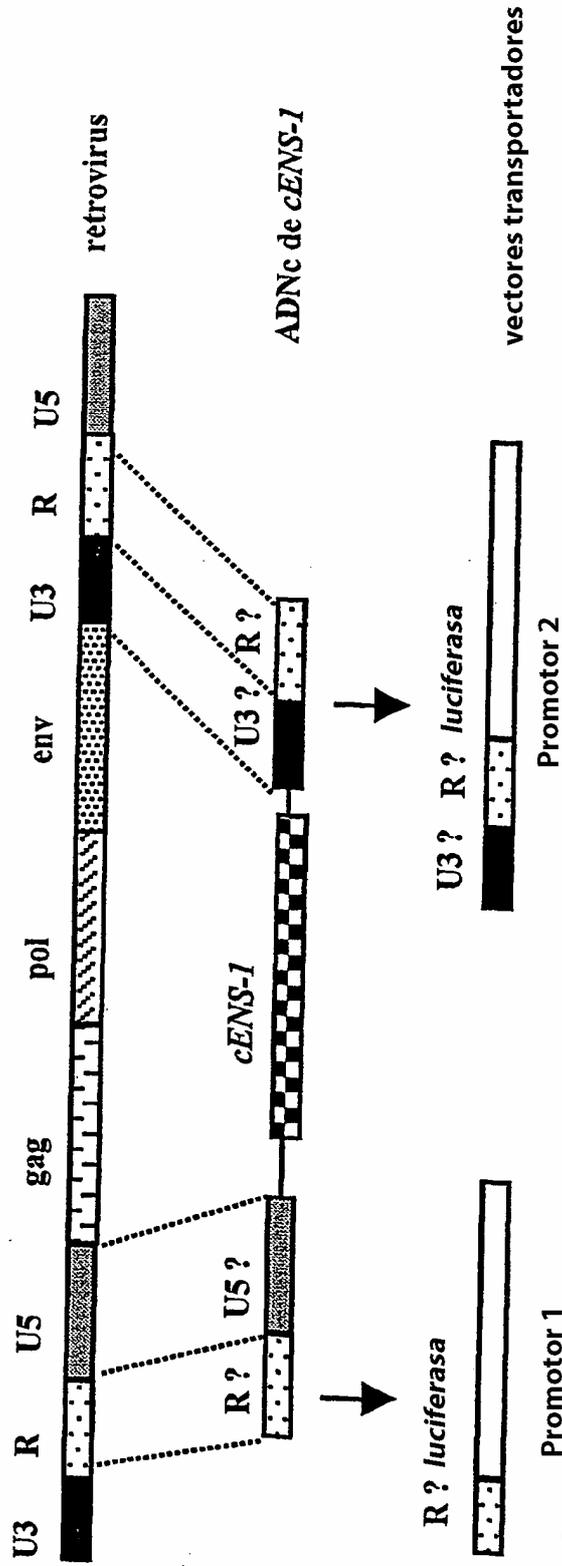


FIG.12

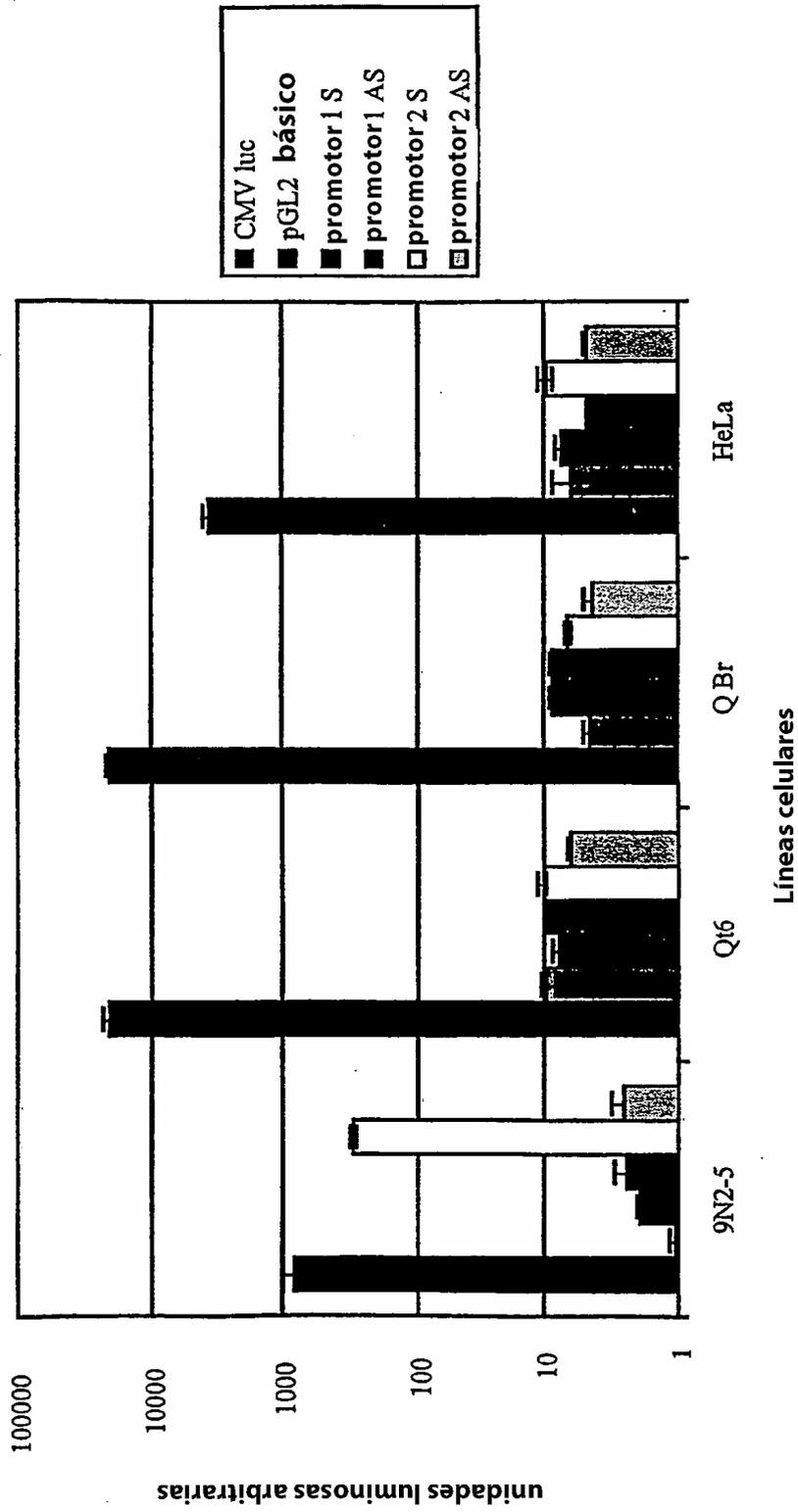


FIG.13

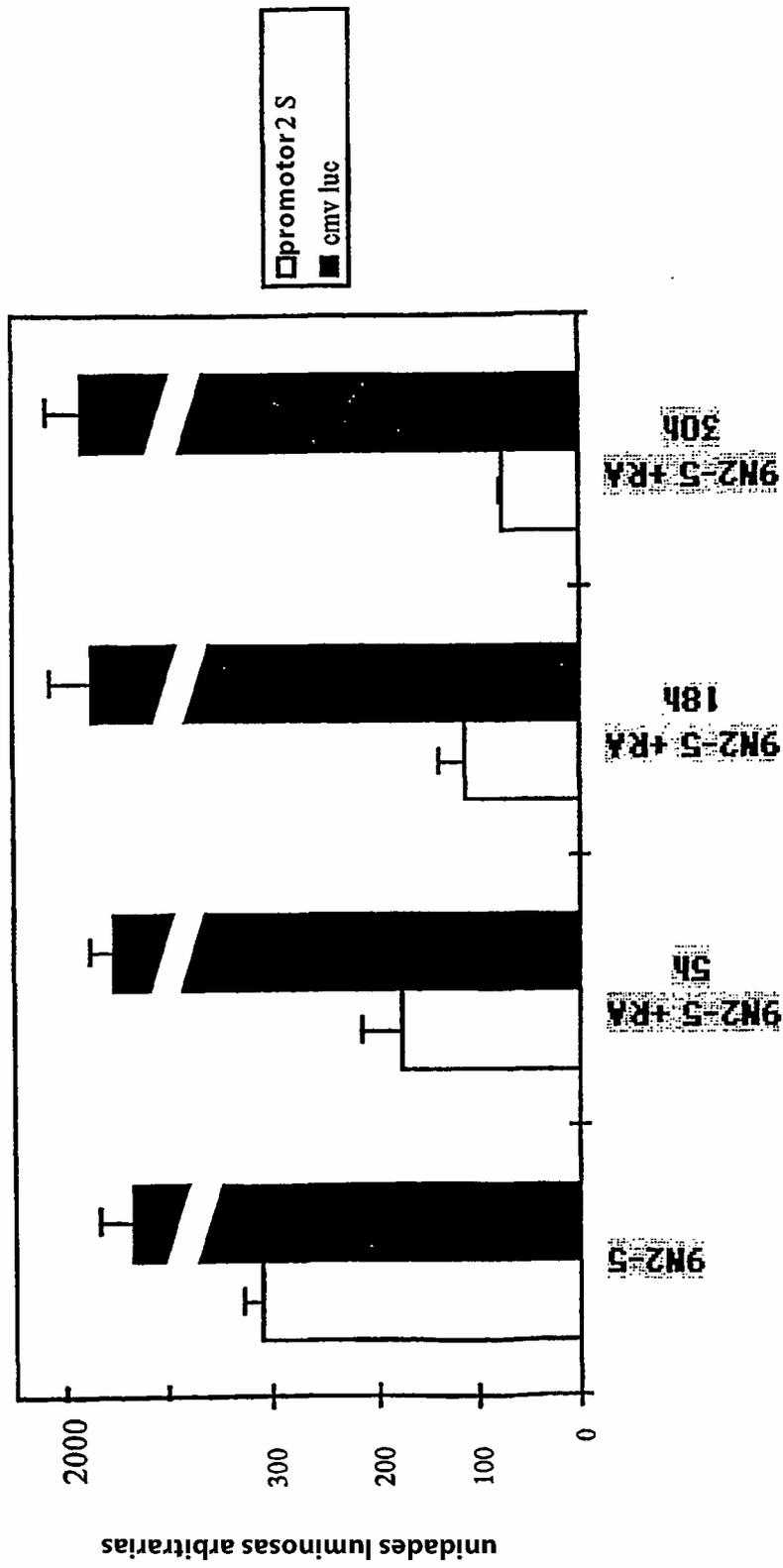


FIG.14