



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 595**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0735 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01108584 .2**
96 Fecha de presentación : **20.10.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **1149899**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2001**

54 Título: **Medio de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares.**

30 Prioridad: **21.10.1994 FR 94 12598**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2011

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: **Samarut, Jacques y**
Pain, Bertrand

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 360 595 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

Medio de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares.

5 La presente invención se refiere a la obtención de células ES aviares, en particular a un procedimiento de cultivo y a un medio que permite el cultivo de estas células.

10 En efecto, en el ámbito de la puesta a punto de técnicas de producción de proteínas recombinantes, el desarrollo de una técnica de transgénesis en los pájaros domésticos tendrá unas repercusiones económicas extremadamente importantes en dos aplicaciones principales:

- 1. el desarrollo de cepas aviares que presentan unos caracteres genéticos determinados (resistencia a ciertas enfermedades, rendimientos de crecimiento, etc.)
- 15 - 2. el desarrollo de sistemas de producción de proteínas recombinantes en el albumen del huevo.

20 La industria biotecnológica se interesa cada vez más en la posibilidad de producir unas proteínas de interés en unos fluidos biológicos o unos organismos (sangre, leche, plantas, etc.). La producción de dichas proteínas en el huevo de pájaro doméstico constituirá seguramente en esta vía un avance tecnológico principal por varias razones:

- numerosas proteínas de mamíferos no pueden ser producidas en sistema mamífero puesto que su superabundancia en estos organismos presenta unos efectos deletéreos (ejemplo; la eritropoyetina que en el conejo induce unas hiperglobulinemias patológicas). Muchas de estas proteínas de interés no presentan ninguna actividad cruzada con las de los pájaros, permitiendo así su superproducción en un organismo aviar sin efecto patológico mayor;
- es muy posible que la comercialización de proteínas recombinantes producidas en unos mamíferos se enfrentará a unos problemas sanitarios relacionados con la presencia en esta especie de organismos latentes potencialmente patógenos para el ser humano (lentivirus, priones, etc.). Este riesgo es muy mínimo, por no decir casi inexistente, para unos agentes patógenos de los pájaros domésticos;
- el huevo constituye un "tejido" muy denso en un pequeño número de proteínas. Por ejemplo, la proteína principal del huevo de pájaro, la ovoalbúmina representa 54% de las proteínas de la clara de huevo, es decir un peso seco medio por huevo de 2 gramos de materia seca aproximadamente. Se puede imaginar razonablemente producir por huevo por lo menos 10% de esta masa en proteína recombinante. La rentabilidad económica aparece muy elevada si se considera que una gallina pone como media 2 huevos cada tres días, y esta rentabilidad aparece muy superior a la de grandes mamíferos si se consideran los costes de cría mucho menores de los pájaros domésticos.

40 La realización de pájaros transgénicos es posible actualmente con un coste extremadamente elevado a causa de su eficacia tan baja. En efecto, en los pájaros, la técnica de microinyección de ADN en el huevo es casi imposible. Por otro lado, la utilización del sistema de los retrovirus vectores, el único sistema eficaz hoy en día, sigue siendo complejo y se enfrenta ciertamente a una reticencia por parte de los industriales por razones sanitarias.

45 Un avance muy importante para la realización de animales transgénicos ha sido aportado en el ratón por el desarrollo de la tecnología de las células ES.

50 Las células ES (por Embryonic Stem cells) son unas células embrionarias totipotentes capaces de regenerar todos los tejidos del embrión, incluyendo el tejido germinal, después de su inyección en unos embriones muy precoces. Estas células pueden ser consideradas por lo tanto como unos caballos de Troya para inducir nuevas informaciones genéticas en el patrimonio genético de un animal. La posibilidad de cultivar estas células a largo plazo *in vitro*, ofrece la posibilidad de ejercer numerosos controles antes de su implantación *in vivo*. Por otra parte, estas células pueden ser conservadas de manera ilimitada en el nitrógeno líquido, lo cual constituye una posibilidad de almacenamiento de un patrimonio genético.

55 El uso de células ES constituye hoy en día en los pájaros domésticos, la vía más prometedora para la realización eficaz de animales transgénicos.

60 La solicitud WO 93/23528 da a conocer un medio de cultivo para las células ES aviares que contienen LIF. (Leukemia Inhibitory Factor).

65 Unos trabajos recientes de un grupo canadiense (R. Etches en la estación de Guelph) han sugerido que unas células ES deben existir en el embrión de pájaro (Petitte *et al.*, 1990). Este grupo ha conseguido el trasplante de dichas células en unos embriones, y a continuación, la producción de animales cuyo patrimonio genético se deriva de las células injertadas. Sin embargo, en la actualidad, no se ha podido conseguir el cultivo de estas células *in vitro*; por consiguiente, estas células no han podido ser utilizadas para transferir de manera estable un transgén.

Constituye un bloqueo principal para la explotación de la técnica de las células ES en los pájaros. Las células ES pueden ser caracterizadas por tres tipos de criterios esenciales:

- morfología
- actividad fosfatasa alcalina endógena
- reacción con unos anticuerpos específicos de un estado de totipotencia (ECMA-7, SSEA-1 y SSEA-3 en particular).

No se ha podido obtener hasta ahora ningún cultivo de células ES identificadas por el conjunto de estas características.

Por eso, la presente invención tiene por objeto un medio de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares del tipo que comprende un medio de cultivo para células aviares.

Llegado el caso, el medio de cultivo está sustancialmente desprovisto de ácido retinoico activo.

De manera ventajosa, el ácido retinoico está sustancialmente desactivado por unos anticuerpos anti-ácido retinoico (ARMA) presentes en el medio.

En efecto, los medios utilizados contienen frecuentemente suero, del cual no se puede controlar la cantidad endógena de ácido retinoico. Ensayando el efecto de la incorporación al medio de cultivo de un anticuerpo monoclonal anti-ácido retinoico que neutralizaría la acción de este último, sobre la diferenciación de las células, el solicitante ha constatado que la presencia de este anticuerpo aumenta la presencia en los cultivos de células y colonias con actividad fosfatasa alcalina.

Más específicamente, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares (o células ES aviares), caracterizado porque:

1) Se suspenden unas células que proceden de discos blastodérmicos de huevos de pájaros fecundados en un medio de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares, del tipo que comprende un medio de cultivo para células aviares, que comprende:

- a) b-FGF, SCF y LIF, o
- b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, e IGF-1, o
- c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF e IGF-1.

(bFGF = basic Fibroblast Growth Factor; SCF = Stem Cell Factor; LIF = Leukemia Inhibitory Factor; IL11 = Interleukin 11; IL6 = Interleukin 6; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor-1; aSCF = avian Stem Cell Factor)

2) Se inocula un tapiz de células nutricias con la suspensión obtenida al final de la etapa a),

3) Se ponen las células a incubar,

4) Las células en cultivo son extraídas y purificadas con el fin de recuperar unas células ES aviares.

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención entre las etapas 3) y 4), se efectúan una o varias adiciones escalonadas en el tiempo de medio nuevo idéntico al utilizado en la etapa 1).

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención, el medio de cultivo está esencialmente desprovisto de ácido retinoico activo.

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención, el medio de cultivo comprende un tapiz de células nutricias.

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención entre las etapas 3) y 4), se efectúa la adición de medio nuevo al 3º día, y después todos los días.

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención, la etapa 4) se efectúa mediante un tratamiento enzimático, lavado en un medio que no contiene ningún factor de crecimiento y centrifugación.

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención al final de la etapa 4), se efectúa una etapa 5) en la que las células ES son reinoculadas sobre un tapiz de células nutricias, en presencia de dicho medio de cultivo, de manera que se obtenga un cultivo secundario.

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención, las etapas 4) y 5) se repiten varias veces.

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención, entre las etapas 3) y 4) se efectúa una o varias

adiciones escalonadas en el tiempo, del medio nuevo idéntico al utilizado en la etapa 1).

Ventajosamente, en el procedimiento de cultivo según la invención, durante la etapa 3), se efectúa una reinoculación del medio mediante una suspensión de células idéntica a la suspensión preparada en la etapa 1).

5

El medio de la etapa 1) contiene preferentemente los elementos siguientes:

b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 y anticuerpos anti-ácido retinoico.

10

Según uno de los aspectos de la invención, contiene además los compuestos siguientes:

- Suero fetal bovino.
- Suero de gallina
- Conalbúmina
- Aminoácidos no esenciales
- Piruvato de sodio
- Stock de nucleósidos
- Hepes (1M)
- β-mercaptoetanol
- Penicilina
- Estreptomicina
- Gentamicina

15

20

25

estando el stock de nucleósidos constituido por la mezcla: adenosina, guanosina, citidina, uridina y timidina en disolución acuosa.

Facultativamente, durante el procedimiento según la invención, se efectúa entre las etapas 3) y 4) la adición de medio nuevo al 3º día y después se cambia el medio cada día hasta el próximo trasplante.

30

La etapa 4) puede ser efectuada en particular mediante tratamiento enzimático, lavado en un medio que no contiene ningún factor de crecimiento y centrifugación.

35

Se pueden recoger directamente los cultivos primarios de células, que después se congelarán, o bien realizar unos cultivos secundarios sucesivos a partir de las células del cultivo primario. En este caso, al final de la etapa 4) se efectúa una etapa 5) en la que las células ES se vuelven a inocular sobre un tapiz de células nutricias, o sobre cajas gelatinizadas, de manera que se obtenga un cultivo secundario.

Las etapas 4) y 5) se pueden repetir varias veces para obtener unos cultivos terciarios y sucesivos.

40

El tapiz de células nutricias puede estar constituido por diferentes tipos de células descritas anteriormente, en particular por células STO mitomicinadas o irradiadas.

45

Otro de los objetos de la invención es un cultivo de células ES aviares, susceptibles de ser obtenidas mediante el procedimiento de cultivo según la invención definido anteriormente y tal como está definido por la reivindicación 9. Una célula embrionaria totipotente aviar modificada puede ser obtenida mediante la integración del gen que codifica para una proteína heteróloga en el genoma de una célula ES aviar en cultivo.

50

La presente invención tiene asimismo por objeto un cultivo de células ES aviares *in vitro* susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento de cultivo según la invención; comprendiendo dicho cultivo un medio de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares que comprende:

- a) b-FGF, SCF y LIF, o
- b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, e IGF-1, o
- c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF e IGF-1.

55

(bFGF = basic Fibroblast Growth Factor; SCF = Stem Cell Factor; LIF = Leukemia Inhibitory Factor; IL11 = Interleukin 11; IL6 = Interleukin 6; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor-1; aSCF = avian Stem Cell Factor)

60

Ventajosamente, el cultivo de células ES aviares según la invención presenta 2 a 3 veces más de colonias positivas para la actividad alcalina fosfatasa con respecto al fondo constituido en su mayor parte por células poco positivas.

Ventajosamente, en el cultivo de células ES aviares según la invención, las células reaccionan específicamente con por lo menos un anticuerpo seleccionado de entre ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 y EMA-6.

Ventajosamente, en el cultivo de células ES aviares según la invención, las células no reaccionan con el anticuerpo TROMA-1.

5 Ventajosamente, en el cultivo de células ES aviares según la invención, las células son modificadas mediante la integración del gen que codifica para una proteína heteróloga.

El factor de crecimiento de las células cepas (o SCF) es preferentemente el a-SCF (o avian Stem Cell Factor) y el m-SCF (o murine Stem Cell Factor).

10 Uno de los aspectos preferidos de la invención se refiere a un medio de cultivo que contiene, además de los elementos nutritivos básicos necesarios para el crecimiento de células, una combinación de b-FGF, SCF y LIF. Además, la presencia en el medio de un anticuerpo monoclonal que neutraliza la actividad de diferenciación ejercida por el ácido retinoico aumenta el número de células cepas embriónicas totipotentes.

15 La presencia de un tapiz de células nutricias favorece el crecimiento de las células ES aviares. Se pueden utilizar diversos tipos de células conocidas por el experto en la materia: se pueden citar en particular unas células tales como las células STO, tratadas con miomicina o irradiadas, las células GRL-3A, las células LMH, las células QT6 y las células QT6 modificadas tales como las células QT6 isolde, las células diferenciadas establecidas en línea a partir de los cultivos de células cepas embrionarias inducidas para diferenciar.

20 Las células STO son unos fibroblastos de embriones de ratón (catálogo ATCC): las células BRL-3A (catálogo ATCC) son unas células de hígado de "Buffalo rat liver". Las células QT6 (catálogo ATCC) y las células QT6 modificadas tales como las células QT6 isolde son unos fibroblastos de codorniz (Cosset *et al.*, 1990, J. Virol. 64, 10170-1078) y las células LMH proceden de carcinoma de hígado de pollo (Kawaguchi *et al.*, 1987, Cancer Res., 47, 4460-4464).

25 El medio de cultivo contiene además diferentes elementos nutritivos esenciales, y unos antibióticos.

Un medio de cultivo particularmente adaptado a la presente invención posee la composición siguiente:

Ers-21	
Suero fetal de bovino	10%
Suero de pollo	2%
Conalbúmina	20 ng/ml
Aminoácidos no esenciales	1%
Piruvato de sodio	1 mM
Stock de nucleósidos	1%
Hepes (1M)	10 mM
β-mercaptoetanol	-0,2 mM
Penicilina	100 U/ml
Estreptomicina	100 µg/ml
Gentamicina	10 ng/ml

30 Aditivos:

Final

35 bFGF de 1 a 20 ng/ml

a-SCF de 0,5% a 296 vol SN de COS/vol

40 IGF-1 de 5 a 50 ng/ml

LIF de 1.000 a 5.000 U/ml de forma purificada, es decir alrededor de 0,1% a 2% vol/vol de sobrenadante de cultivo de células COS transfectadas

45 IL-6 de 5 a 50 ng/ml (aproximadamente de 0,1% a 2% vol/vol de sobrenadante de cultivo de células COS transfectadas)

IL-11 de 5 a 50 ng/ml (aproximadamente de 0,1% a 2% vol/vol de sobrenadante de cultivo de células COS transfectadas)

50 De manera ventajosa, la concentración en bFGF es superior a 5 ng/ml y la concentración en IGF-1 es superior a 10 ng/ml.

estando el stock de nucleósidos constituido por la mezcla:

adenosina	80 mg
guanosina	85 mg
citidina	73 mg
uridina	73 mg
timidina	24 mg
H ₂ O	100 ml

5 y representando SN de Cos un sobrenadante de cultivo de células COS-7 transfectadas en expresión transitoria con un vector de expresión del ADNc del factor considerado,

y que conviene para el cultivo de células embrionarias totipotentes de pájaro.

10 El medio BHK21 (o medio MEM) es un medio de cultivo que ha sido descrito en particular por Mc Pherson, I., y Stoker (1962, Virology 16, 147).

Hepes es hidroxietil-piperazin-etano-sulfonato.

15 Por último, se da a conocer un procedimiento de producción de una proteína recombinante, caracterizado porque se integra el gen que codifica para dicha proteína en el genoma de una célula embrionaria totipotente aviar en cultivo.

20 El solicitante ha puesto a punto un medio de cultivo y unas condiciones de cultivo *in vitro* que permiten mantener en cultivo unas células aviares que presentan unas propiedades morfológicas, cinéticas e histoquímicas que recuerdan las de las células embrionarias totipotentes. Estas observaciones han sido efectuadas tanto con unas células que se derivan de discos blastodérmicos de codorniz como de pollo. El crecimiento de estas células en cultivo *in vitro* se hace posible por la puesta a punto de un medio original especialmente adaptado para el cultivo de células embrionarias de pájaro. Se sabe que la presencia, el mantenimiento y la propagación de células totipotentes en cultivo permiten su inyección en unos embriones receptores. La contribución a la morfogénesis de los tejidos somáticos y germinales en los animales receptores gracias a un carácter totipotente, puede conducir a la obtención de animales transgénicos.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar la invención sin limitarla de ninguna manera. En estos ejemplos se hará referencia a las figuras siguientes:

30 Figura 1: Efecto de las combinaciones de factores

- blastodermos de codorniz, 0,75 bl/ml
- fondo de gelatina
- Cultivo de 3 d

35

Figura 2: efecto del anticuerpo anti-ácido retinoico (ARMA)

- blastodermos de codorniz, 0,75 bl/ml
- fondo con o sin gelatina
- Cultivo de 4 d

40

Figura 3: comparación de diferentes citocinas

- blastodermos de codorniz, 2 bl/ml
- fondo con gelatina
- Cultivo de 2 + 3 d

45

Figura 4: Comparación de una inoculación sobre gelatina y sobre tapiz de células tratadas con mitomicina C en presencia de diferentes citocinas que pertenecen todas a la misma familia.

50

- 4A:
- blastodermos de codorniz, 1+1,5 bl/ml
 - fondo con gelatina
 - cultivo de 3 + 4 d

55

- 4B:
- blastodermos de codorniz, 1+1,5 bl/ml
 - fondo con células STO
 - cultivo de 3 + 4 d

Figura 5: Actividad fosfatasa alcalina y reconocimiento mediante ECMA-7

- blastodermos de codorniz, 1,5 bl/ml
- fondo con células STO
- cultivo de 2 + 3 d

5

Figura 6: Actividad fosfatasa alcalina y reconocimiento mediante NC-1

- blastodermos de codorniz, 1,5 bl/ml
- fondo con células STO
- cultivo de 2 + 3 d

10

Figura 7: Animales quiméricos obtenidos mediante inyección *in ovo* en unos embriones de células mantenidas en cultivo. Células inyectadas después de 8 ó 10 días de cultivo.

15

Materiales y métodos

Preparación de las células

Los huevos de gallinas recientemente puestos, no incubados, corresponden a la etapa X del desarrollo (Eyal Giladi y Kovak, 1976); los huevos de codorniz "*C. coturnix japonica*" son utilizados asimismo a partir de la puesta y no incubados.

20

El disco blastodérmico (3-4 mm de diámetro para la gallina, 2-2,5 mm para la codorniz) se extrae con la ayuda de una pipeta pasteur en medio completo sin factores. Las células son centrifugadas a 200 g, lavadas dos veces en medio con el fin de eliminar el máximo de vitelo contaminante, se resuspenden a razón de 2 discos por 1 ml de medio y se desasocian mecánicamente mediante paso en una aguja de 23G. Se añaden entonces los factores.

25

La suspensión celular se deposita:

- o bien sobre cajas o pocillos (Costar) previamente gelatinizados (0,2% de gelatina, 1h a temperatura ambiente),
- o bien en un tapiz de células STO previamente tratadas con mitomicina C (90 minutos, 37°C, 5 µg/ml) e inoculadas de nuevo a razón de 10⁵ células/cm².
- o bien en un tapiz de células isolate previamente tratadas con mitomicina C (90 minutos, 37°C, 5 µg/ml) e inoculadas de nuevo a razón de 10⁵ células/cm².

30

35

Medio de cultivo STO:

	DMEM	Final
	Suero fetal bovino	10%
	Penicilina	100 U/ml
	Estreptomicina	100 µg/ml
	L-glutamina	2 mM

40

Medio de cultivo isolate:

	DMEM	Final
	Suero fetal bovino	8%
	Suero de pollo	2%
	Penicilina	100 U/ml
	Estreptomicina	100 µg/ml
	G418	100 µg/ml
	Higromicina	50 µg/ml
	Fleomicina	50 µg/ml
	TBP (caldo de triptosa fosfato)	10%

Las drogas de selección son añadidas en mantenimiento pero retiradas dos días antes del tratamiento con mitomicina C.

45

En todos los casos, se realiza una segunda inoculación en las mismas condiciones después de dos días de cultivo.

Cultivos

5 Los cultivos son incubados a 37°C o a 41°C, en una atmósfera controlada en CO₂ (7,5%) y su evolución se sigue al microscopio en contraste de fase. Una adición parcial (50%) de medio nuevo con los factores se realiza el 3^{er} día de cultivo, y después se cambia el medio todos los días. En cada momento, las células en crecimiento pueden ser fijadas para estudio, o bien extraídas para ser inoculadas otra vez en cultivo secundario o superior, sobre unos tapices de células STO mitomicinadas irradiadas o sobre cajas gelatinizadas.

10 En caso de fijación, las células se lavan en Tris-glucosa dos veces, y después se fijan *in situ* durante 15 minutos en una disolución de paraformaldehído al 4% en frío (0-4 °C). Después de varios lavados con PBS, se pueden realizar diferentes coloraciones según uno de los protocolos siguientes:

* detección de la actividad fosfatasa alcalina endógena,

Tampón de reacción:	NaCl	100 mM
	Tris HCl pH 9,5	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	NBT	1 mg/ml
	BCIP	0,1 m/ml
	H ₂ O	

(tiempo de lectura de 5 a 30 minutos, 37°C)

15 ** detección de la actividad de β-galactosidasa exógena

Tampón de reacción:	Ferricianuro de K	5 mM
	Ferrocianuro de K	5 mM
	MgCl ₂	5 mM
	X-gal	1 mg/ml
	PBS	

(tiempo de lectura de 1 a 2 horas, 37°C)

20 *** detección mediante inmunocitoquímica de la presencia de epítomos específicos (reacción a 4°C)
 bloqueo en tampón PBS- BSA (1 mg/ml)
 lavado en PBS- BSA
 anticuerpo primario 1/10^a o 1/50^a
 anticuerpo secundario fluorescente 1/50^a la detección se realiza bajo microscopio invertido con fluorescencia.

25 Trasplante

30 En caso de paso por cultivo secundario o sucesivo, las células se lavan en Tris-glucosa dos veces, y después se incuban durante 10-30 minutos en una disolución enzimática. Se puede utilizar una disolución de colagenasa-dispasa (1 mg/ml, es decir 1 U/ml final) a la que se puede añadir una disolución de hialuronidasa (1 mg/ml final es decir 1 U/ml); se puede utilizar asimismo una disolución de pronasa a 0,25 mg/ml final. Las células o los pequeños montones de células así aisladas enzimáticamente son lavadas en medio ESA, resuspendidas, depositadas sobre un cojín de medio de separación de linfocito de densidad (d = 1,077-1,080) y centrifugadas durante 20 minutos a temperatura ambiente a 800 g con el fin de librar las células no diferenciadas de blastodermos de las células del tapiz, de los diversos residuos y de los restos de vitelo contaminantes. La interfaz se extrae entonces, se lava dos veces en medio ESA. El residuo celular obtenido se resuspende y se desasocia ligeramente de forma mecánica antes de ser inoculado sobre un nuevo tapiz de células nutricias, tal como se ha descrito anteriormente. El equivalente de 6 discos blastodérmicos iniciales se vuelve a inocular en 2 ml. Esta etapa de gradiente, a veces, no es necesaria durante los pasos sucesivos, en función de la homogeneidad tan grande de los cultivos obtenidos.

40 Las células desasociadas pueden ser depositadas sobre un gradiente multicapa de Percoll y centrifugadas en las mismas condiciones. Las interfaces son entonces extraídas, lavadas en un medio ESA y las células más inmaduras de las interfaces superiores re-inoculadas, o inyectadas en unos embriones receptores.

45 Congelación

50 Al final del cultivo primario o sucesivo, las células recuperadas de gradiente pueden ser congeladas en una mezcla constituida por 40% de FBS, 50% de medio ESA y 10% de DMSO. Las células que equivalen a 24 blastodiscos iniciales son recogidas en 0,5 ml de medio ESA, resuspendidas y se añade 0,4 ml de suero. Se añade entonces 0,1 ml de DMSO muy lentamente. La suspensión de congelación se reparte en unos tubos a congelación (0,5 ml/tubo) y se congela lentamente hasta -80°C antes de ser transferida en el nitrógeno líquido.

Resultados

Se ha preparado un medio básico denominado medio "ESA" por "Embryonic Stem cells Avian" que se deriva de un medio utilizado para las células ES murinas. Presenta la composición siguiente:

5

Medio "ESA"

	Final
BHK-21	
Suero fetal bovino	10%
Suero de pollo	2%
Conalbúmina	20 ng/ml
Aminoácidos no esenciales	1%
Piruvato de sodio	1 mM
Stock de nucleósidos	1%
Hepes (1M)	10 mM
β-mercaptoetanol	0,2 mM
Penicilina	100 U/ml
Estreptomicina	100 µg/ml
Gentamicina	10 ng/ml

10

A este medio de base "ESA", se han añadido unos factores de crecimiento con el fin de comparar su contribución respectiva a la formación de colonias que presentan un carácter morfológico y bioquímico interesante. Sus concentraciones se indican a continuación:

Aditivos:

	stock	final
bFGF	10 µg/ml	10 ng/ml
a-SCF	SN de Cos trans*	1% vol/vol
IGF-1	10 µg/ml	20 ng/ml
LIF	SN de Cos trans*	1% vol/vol
IL-11	10 µg/ml	10 ng/ml
IL-6	10 µg/ml	10 ng/ml
ARMA	10 mg/ml	1 µg/ml
OSM	20 µg/ml	20 ng/ml
CNTF	20 µg/ml	20 ng/ml

15

Stock de nucleósidos

Adenosina	80 mg
Guanosina	85 mg
Citidina	73 mg
Uridina	73 mg
Timidina	24 mg
H ₂ O	100 ml

* sobrenadante de cultivo de células COS-7 transfectadas en expresión transitoria con un vector de expresión del ADNc del factor considerado.

20

El primer criterio utilizado para evaluar el efecto de estos factores y de las modificaciones aportadas al medio ha sido la detección por coloración bioquímica de la actividad fosfatasa alcalina endógena que parece específica de un cierto número de células tales como las células ES totipotentes, las células precursoras derivadas de la línea germinal y ciertas células diferenciadas, fácilmente identificables por su morfología epitelioide.

25

Las células de los discos blastodérmicos son inoculadas en medio ESA en presencia de diferentes combinaciones de factores. Después de 3 días de cultivo, las células son fijadas, coloreadas y se cuentan las colonias positivas para la actividad fosfatasa alcalina (AP+).

El efecto de las diferentes combinaciones de factores se representa en la figura 1.

30

Conclusión

Entre los factores ensayados, la combinación del SCF (Stem Cell Factor de origen murino -mSCF- o aviar -aSCF-), del b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor) y del LIF (Leukemia Inhibitory Factor) proporciona el mejor número de

colonias positivas para la actividad fosfatasa alcalina en los cultivos con un aumento de 2-3 veces con respecto a la presencia de cada factor añadido individualmente o de dos en dos y con respecto al fondo, constituido en su mayor parte por células poco positivas y que presentan una morfología epitelioide diferenciada.

5 II) Efecto del anticuerpo anti-ácido retinoico (ARMA)

Las células son inoculadas o bien sobre cajas no tratadas, o bien tratadas con gelatina en medio ESA completo con factores de crecimiento aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) y LIF (Leukemia Inhibitory factor). El anticuerpo ARMA se añade a razón de 1 µg/ml final. Las células y las colonias positivas para la actividad fosfatasa alcalina (AP+) son calculadas después de 4 días de cultivo.

Los resultados se representan en la figura 2.

15 En comparación con los diferentes medios descritos tal como la utilización de resina o de carbón, y ensayados para intentar controlar el nivel de ácido retinoico en el medio, la adición del anticuerpo anti-ácido retinoico en el medio proporciona los mejores resultados en cuanto a la calidad y a la cantidad de las colonias presentes en los cultivos.

20 Conclusión

La adición del anticuerpo anti-ácido retinoico en el medio de cultivo aumenta de manera notable la presencia y/o el mantenimiento de las colonias con actividad fosfatasa alcalina.

25 III) Efectos de las citocinas

Se ha querido verificar si el UF u otras citocinas de la misma familia podían inducir la proliferación de las células ES en el pájaro.

30 Las células son inoculadas en medio ESA completo con unos factores de crecimiento aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) en presencia de ARMA (1 µg/ml) y después de la adición o no de diferentes citocinas de la misma familia LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukin 11) e IL-6 (Interleukin 6). Con el fin de aumentar la adhesión y la formación de colonias fosfatasa alcalina positivas así como su tamaño, una segunda inoculación tiene lugar 2 días después de la primera. La fijación, coloración y lectura de las colonias tiene lugar 3 días después de la segunda inoculación.

35 La comparación del efecto de las diferentes citocinas se representa en la figura 3.

Conclusión

40 El papel de las citocinas LIF, IL-11 e IL-6 parece particularmente pronunciado y prácticamente equivalente en la obtención de colonias positivas para la actividad fosfatasa alcalina.

IV) Papel de un tapiz de células nutricias

45 En el ratón, el crecimiento de ciertas células ES requiere la presencia de un tapiz de células nutricias. Se ha ensayado el efecto de estas células sobre las células de embriones de pájaro.

50 Las células son inoculadas en un medio ESA completo con factores de crecimiento aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) y el anticuerpo ARMA (1 µg/ml) comparativamente o bien en un fondo de gelatina, o bien en un tapiz de células STO tratadas con mitomicina C tal como se ha indicado en el párrafo Material y Métodos. Después de tres días de cultivo, se añade una nueva inoculación al cultivo. Las citocinas CNTF (Ciliary Neuro-Trophic Factor), OSM (Oncostatin M), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukin 11) e IL-6 (Interleukin 6) son añadidas en el medio a las concentraciones indicadas anteriormente.

55 La figura 4A representa el crecimiento de células sobre gelatina en presencia de diferentes citocinas. La figura 4B representa el crecimiento de células sobre un tapiz de células nutricias en presencia de las mismas citocinas.

60 Conclusión

65 El número de colonias que se derivan de las células de blastodermos y que presenta una actividad fosfatasa alcalina aumenta muy claramente en presencia de un tapiz de células nutricias (aproximadamente 4-5 veces) con un mantenimiento entre los dos sistemas de las mismas sensibilidades frente a las citocinas añadidas en el medio. Las citocinas LIF, IL-11 e IL-6 presentan los mejores resultados de estimulación de crecimiento. En unos resultados preliminares, aparece además que la combinación de estas 3 citocinas en el medio completo ESA con factores produce unos efectos acumulativos muy prometedores en cuanto al mantenimiento y a la proliferación de las

colonias tanto con unas células derivadas de discos blastodérmicos de codorniz como de pollo.

V) Características inmunocitoquímicas

5 Se han realizado unos estudios de reactividad con respecto a diferentes anticuerpos. Los anticuerpos ECMA-7, SSEA-1 y SSEA-3, específicos de un estado de totipotencia de las células ES murinas son capaces de reconocer unos epítomos en las poblaciones de células aviares, mantenidas en los cultivos. Para ilustrar estos reconocimientos por los anticuerpos, unos dobles marcajes de la actividad fosfatasa alcalina y anticuerpo demuestran que todas las células o los macizos de células reconocidas por ECMA-7 presentan una actividad fosfatasa alcalina. Esta propiedad ha sido observada con todos los anticuerpos utilizados a diversos grados.

15 Las colonias de células fosfatasa alcalina positivas están para aproximadamente 20% de ellas marcadas por el anticuerpo ECMA-7. Este reconocimiento sugiere la presencia en estos macizos y en estas únicas condiciones de cultivo de células con carácter "ES". Sin embargo, una heterogeneidad en los macizos fosfatasa alcalina positivos supone unos grados variables en la intensidad del carácter "ES".

20 Esta heterogeneidad de distribución ha sido observada sobre unos cultivos primarios. Después de trasplantes, la proporción de células positivas, en particular para ECMA-7, pero también para SSEA-1 y EMA-1, tiende a incrementarse de manera muy importante para obtener unos cultivos muy homogéneos.

La figura 5 muestra respectivamente la actividad fosfatasa alcalina y el reconocimiento por el anticuerpo ECMA-7 de colonias de células procedentes del cultivo de blastodermos de codorniz en presencia de diferentes citoquinas.

25 Los anticuerpos SSEA-1, SSEA-3, utilizados asimismo sobre unas células ES murinas reconocen asimismo unas células aviares en los macizos fosfatasa alcalina positivos.

30 Los anticuerpos NC-1, HNK-1 dirigidos respectivamente de los epítomos de células de crestas neurales y de células "human natural killer" reconocen en realidad los mismos epítomos y han sido mostrados como que reconocen ciertas células inmaduras del disco blastodérmico de pollo. En el presente sistema, estos dos anticuerpos reconocen en este caso también unas células en unos macizos con actividad fosfatasa alcalina.

Los resultados con NC-1 están representados en la figura 6.

35 Las células son inoculadas en un medio ESA completo con unos factores de crecimiento aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) y el anticuerpo ARMA (1 µg/ml) sobre un tapiz de células STO tratadas con mitomicina C tal como se ha indicado en el párafo Material y Métodos. Después de dos días de cultivo, se añade una nueva inoculación al cultivo. Las citocinas LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukin 11) e IL-6 (Interleukin 6) son añadidas en el medio a las concentraciones indicadas anteriormente. La doble coloración, la actividad fosfatasa alcalina y la detección de los epítomos por unos anticuerpos se realizan según los protocolos presentados anteriormente.

45 Por otra parte, el anticuerpo EMA-1 (Hahnel y Eddy, 1986) inicialmente dirigido contra unos epítomos presentes en las células primordiales de la línea germinal murina ha sido utilizado contra estas mismas células en el pollo. Ensayando este anticuerpo en el presente sistema de cultivo, se puede demostrar que EMA-1 reconoce unas células y unas colonias de células que presentan, todas, una actividad fosfatasa alcalina. Por otra parte, se ha verificado que este anticuerpo EMA-1 reconoce las células ES murinas sólo en su estado de totipotencia no diferenciada.

50 Los anticuerpos han sido ensayados o bien sobre unos cultivos no diferenciados obtenidos tales como los descritos en la parte Material y Métodos tal como se ha descrito anteriormente, o bien sobre unos cultivos que han sido tratados con un exceso de ácido retinoico añadido al cultivo (10^{-6} M) durante por lo menos 48 horas. La tabla siguiente indica el estado de reconocimiento por los diferentes anticuerpos utilizados.

Anticuerpo monoclonal	No diferenciados	Diferenciados
ECMA-7	+++++	-
SSEA-1	+++++	-
SSEA-3	+++	-
TEC-01	+++++	-
TEC-02	+	+++
TEC-03	++	++
EMA-1	++++	+
EMA-6	+++	++
TROMA-1	-	++++
NC-1	++++	+
HNK-1	++++	+

NC-1 y HNK-1 reconocen los mismos epítomos (Trucker *et al.*, 1984) SOFA-1 y TEC-01 reconocen los mismos epítomos.

Se observa que la expresión de ECMA-7 (Kemler *et al.*, 1981) es la más importante, sugiriendo una verdadera naturaleza de las células, que TEC-01 (Draber *et al.* (1987b)) y SSEA-1 (Solter y Knowles (1978)) reconocen los mismos epítomos sobre unas células no diferenciadas exclusivamente. A la inversa, el aumento de expresión de TEC-02 (Draber *et al.* (1987a)) puede indicar en este sentido un estado de diferenciación inducido o espontáneo. La terminación de esta pérdida de naturaleza ES se caracteriza por la fuerte expresión de TROMA-1 (Bruler *et al.* (1980)), presente en las únicas células diferenciadas. El conjunto de estos anticuerpos permite por lo tanto tener una idea sobre el estado de diferenciación de un cultivo. Unos anticuerpos tales como TEC-03 (Draber *et al.* (1987a)) aparecen como relativamente indiferentes al estado pronunciado de diferenciación.

Por otra parte, se debe subrayar que hasta ahora ni ECMA-7, ni SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, TEC-02, TEC-03, TROMA-1 han sido objeto de publicación que demuestre la reactividad sobre unos cortes, unas células o cualquier material de origen aviar.

Conclusión

Entre los anticuerpos ensayados, algunos tal como ECMA-7 (Kemler *et al.*, 1981), SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)), SSEA-3 (Shevinsky *et al.* (1982)) son característicos de las células "ES" murinas. Estos anticuerpos reconocen unas células y por lo tanto son potencialmente totipotentes en los cultivos aviares. Las mismas observaciones han sido obtenidas o bien con unos cultivos de codorniz o bien de pollo. Otros anticuerpos tal como EMA-1 (Hahnel y Eddy (1986)), NC-1 y HNK-1 (Obo y Balch (1981)) son conocidos por reconocer unos epítomos aviares (y murino para EMA-1, Urven *et al.* (1988)) de células muy indiferenciadas y por lo tanto también susceptible de reconocer un perfil de células cepas aviares.

VI) Trasplante de las células

Las células de discos blastodérmicos de codorniz o de pollo son inoculadas sobre un tapiz de células nutricias STO. Después de diferentes días de cultivo, las células son trasplantadas sobre un tapiz de células STO tal como se ha descrito en la parte Material y Métodos. La detección de células y macizos positivos al mismo tiempo para la actividad de fosfatasa alcalina y para la localización de un marcaje por ECMA-7 o NC-1 sugiere que las condiciones de cultivos se definen para mantener en los cultivos secundarios y terciarios unas células con carácter totipotente. El proceso de trasplante asegura de hecho justo después del primer paso una homogeneidad al conjunto del cultivo, tanto morfológicamente como mediante la detección de los diferentes epítomos. Los macizos de células se vuelven muy extendidos y homogéneos, carácter incrementado por la gran capacidad de estas células para dividirse rápidamente, al contrario de las células diferenciadas presentes inicialmente en el cultivo primario. Hasta ahora estos criterios de identificación y de caracterización pueden ser utilizados y detectados durante por lo menos 5 semanas después de la inoculación.

VII) Inyección de las células en unos embriones receptores

Las células blastodérmicas de pollo obtenidas en cultivos primarios o después de los trasplantes sucesivos pueden ser inyectadas en unos embriones receptores. Con el fin de visualizar rápidamente una contribución fenotípica de las células del donante en un embrión de pollito receptor, las células mantenidas en cultivo proceden de una cepa pigmentada y los embriones receptores de una cepa no pigmentada. Las células mantenidas en cultivo son desasociadas y preparadas tal como se ha descrito en la parte Material y Métodos según el mismo procedimiento que para un trasplante. La suspensión celular se prepara entonces a razón de 1 a 3×10^5 células por ml de medio ESA. El huevo recientemente puesto, no incubado, que contiene el embrión receptor es ligeramente irradiado entre 5 Gy y 7 Gy. Una pequeña ventana de algunos mm^2 se realiza en la cáscara del receptor mediante amoladura. La membrana de la cáscara se corta con un escalpelo y las células son inyectadas con la ayuda de un capilar estirado en la cavidad subgerminal del disco blastodérmico en un volumen de 1 a 5 μl , lo cual corresponde a 100 a 1.500 de células como máximo. La media de las células inyectadas es de 500 células. La ventana se recubre entonces de membranas de cáscara y se cierra. Un trozo de venda adhesiva se aplica para perfeccionar la estanqueidad y limitar al máximo la evaporación. Después de 4 días de incubación en las condiciones óptimas, los huevos se abren y los embriones bien desarrollados son transferidos a una cáscara más grande y se vuelven a incubar para terminar su desarrollo de manera satisfactoria.

Un cierto número de animales han sido así obtenidos y muestran un índice aparente de quimerismo, fenotípicamente detectable por el marcado de plumaje utilizado y característico de la cepa de las células que se derivan de la cepa donante, que varía de 5% a 90%. Este quimerismo puede ser obtenido hasta ahora indiferentemente con unas células que se derivan de cultivos primarios, secundarios, terciarios. Se debe observar que los porcentajes de animales quiméricos y los índices de quimerismo de estos animales no varían de manera importante en función del tiempo de cultivo de las células inyectadas. Esto contribuye a subrayar la capacidad del medio y al procedimiento descrito para mantener unas células con un carácter totipotente.

Ejemplo: animal de control no inyectado (Fig. 7A)

Animal n° 1786-1787 con bajo índice de quimerismo (5-10%)

Animal n° 1782-1783 con un índice de quimerismo medio (50%)

Animal n° 1740-1741 con un alto índice de quimerismo (90%)

Estos animales están presentados en las figuras 7B a 7D.

Referencias

Bulet *et al.* (1980). *Froc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 4113.

Draber *et al.* (1987a). *Cell Differentiation* 21, 119.

Draber *et al.* (1987b). *Cell differentiation* 21, 227.

Eyal Giladi y Kovak (1976), *Developemental Biology*, 49, 321-337

Hahnel y Eddy (1986). *Gamete Research* 15. 25.

Kemler *et al.* (1981). *J. Embryo. Exp. Morph.* 64, 45.

Obo y Balch (1981). *J. Immunology* 127, 1024.

Petine *et al.* (1990) *Development* 108, 185-189

Solter y Knowles (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 5565.

Shevinsky *et al.* (1982). *Cell* 30, 697.

Tucker *et al.* (1984). *Cell Differentiation* 14, 223.

Urven *et al.* (1988). *Development* 103, 299

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares (o células ES aviares), caracterizado porque:

5 1) Se suspenden unas células que proceden de discos blastodérmicos de huevos de pájaro fecundados en un medio de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares, del tipo que comprende un medio de cultivo para células aviares, que comprende:

- 10 a) b-FGF, SCF y LIF, o
b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, e IGF-1, o
c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF e IGF-1.

15 (bFGF = basic Fibroblast Growth Factor; SCF = Stem Cell Factor; LIF = Leukemia Inhibitory Factor; IL11 = Interleukin 11; IL6 = Interleukin 6; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor-1; aSCF = avian Stem Cell Factor)

2) Se inocula un tapiz de células nutricias con la suspensión obtenida al final de la etapa a),

3) Se ponen las células a incubar,

20 4) Las células en cultivo son extraídas y purificadas con el fin de recuperar unas células ES aviares.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque entre las etapas 3) y 4) se efectúa una o varias adiciones escalonadas en el tiempo, de medio nuevo idéntico al utilizado en la etapa 1).

25 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el medio de cultivo está esencialmente desprovisto de ácido retinoico activo.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el medio de cultivo comprende un tapiz de células nutricias.

30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque entre las etapas 3) y 4) se efectúa la adición del medio nuevo al 3^{er} día, y después todos los días.

35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa 4) se efectúa mediante tratamiento enzimático, lavado en un medio que no contiene ningún factor de crecimiento y centrifugación.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque al final de la etapa 4) se efectúa una etapa 5) en la que las células ES son re-inoculadas sobre un tapiz de células nutricias, en presencia de dicho medio de cultivo, de manera que se obtenga un cultivo secundario.

40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque las etapas 4) y 5) se repiten varias veces.

9. Cultivo de células ES aviares *in vitro* susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo dicho cultivo un medio de cultivo de células embrionarias totipotentes aviares que comprende:

- 45 a) b-FGF, SCF y LIF, o
b) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF, IL-11, IL-6, e IGF-1, o
50 c) b-FGF, aSCF (avian SCF), LIF e IGF-1.

(bFGF = basic Fibroblast Growth Factor; SCF = Stem Cell Factor; LIF = Leukemia Inhibitory Factor; IL11 = Interleukin 11; IL6 = Interleukin 6; IGF-1 = Insulin-like Growth Factor-1; aSCF = avian Stem Cell Factor)

55 10. Cultivo de células ES aviares según la reivindicación 9, caracterizado porque presenta 2 a 3 veces más de colonias positivas para la actividad alcalina fosfatasa con respecto al fondo constituido en su mayor parte por células poco positivas.

60 11. Cultivo de células ES aviares según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque las células reaccionan específicamente con por lo menos un anticuerpo seleccionado de entre ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 y EMA-6.

12. Cultivo de células ES aviares según la reivindicación 11, caracterizado porque las células no reaccionan con el anticuerpo TROMA-1.

65 13. Cultivo de células ES aviares según una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque las células son modificadas por la integración del gen que codifica para una proteína heteróloga.

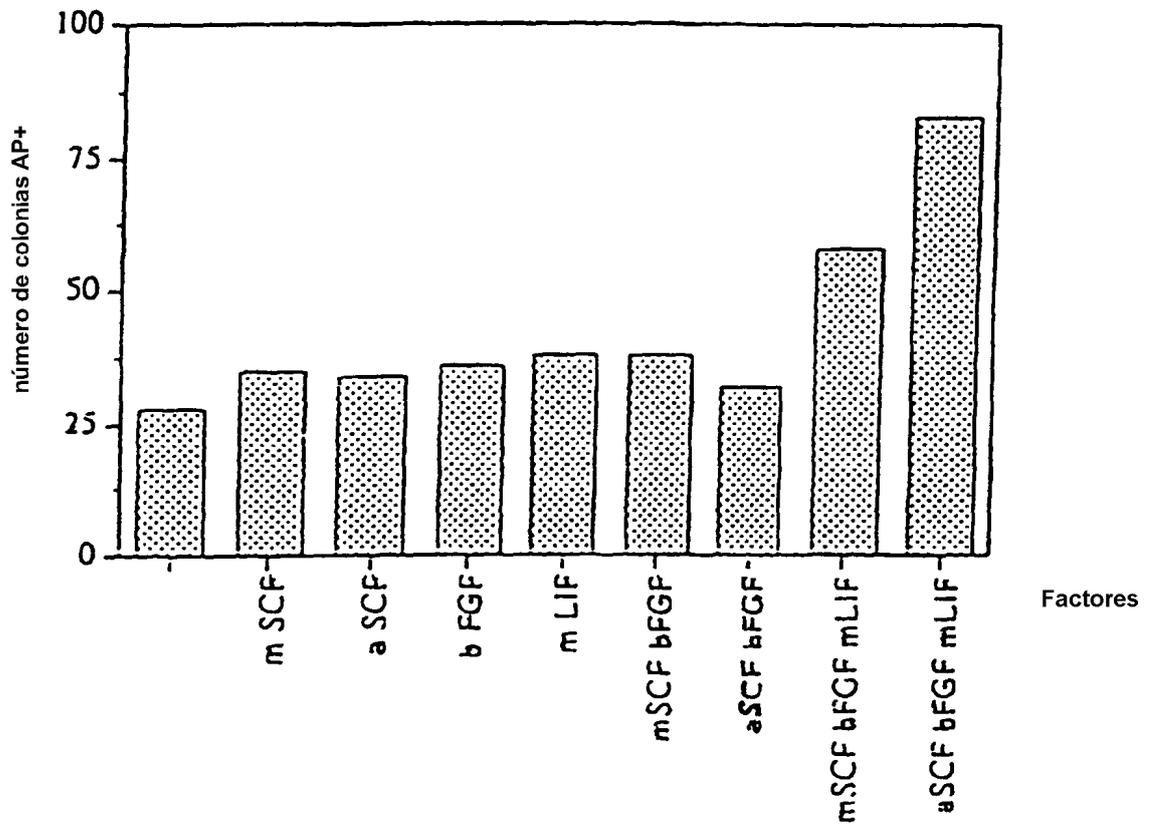


Figura 1

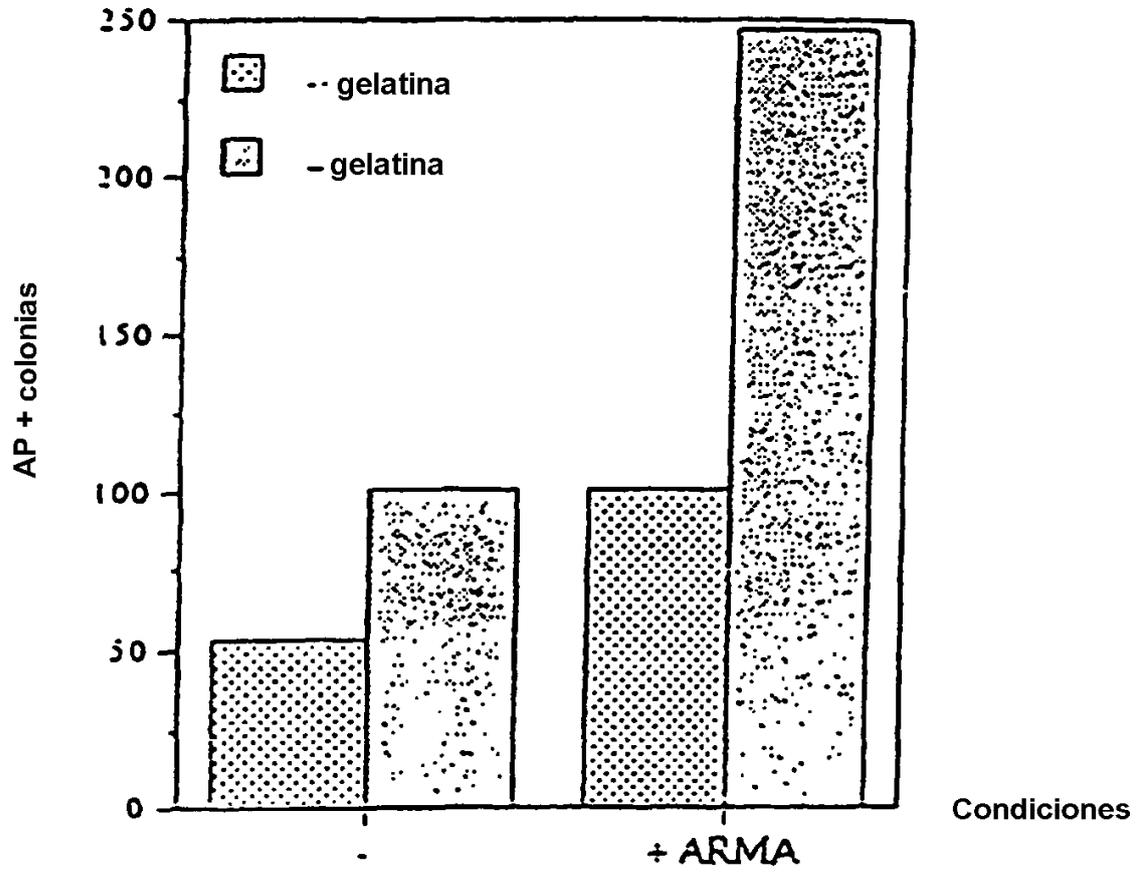


Figura 2

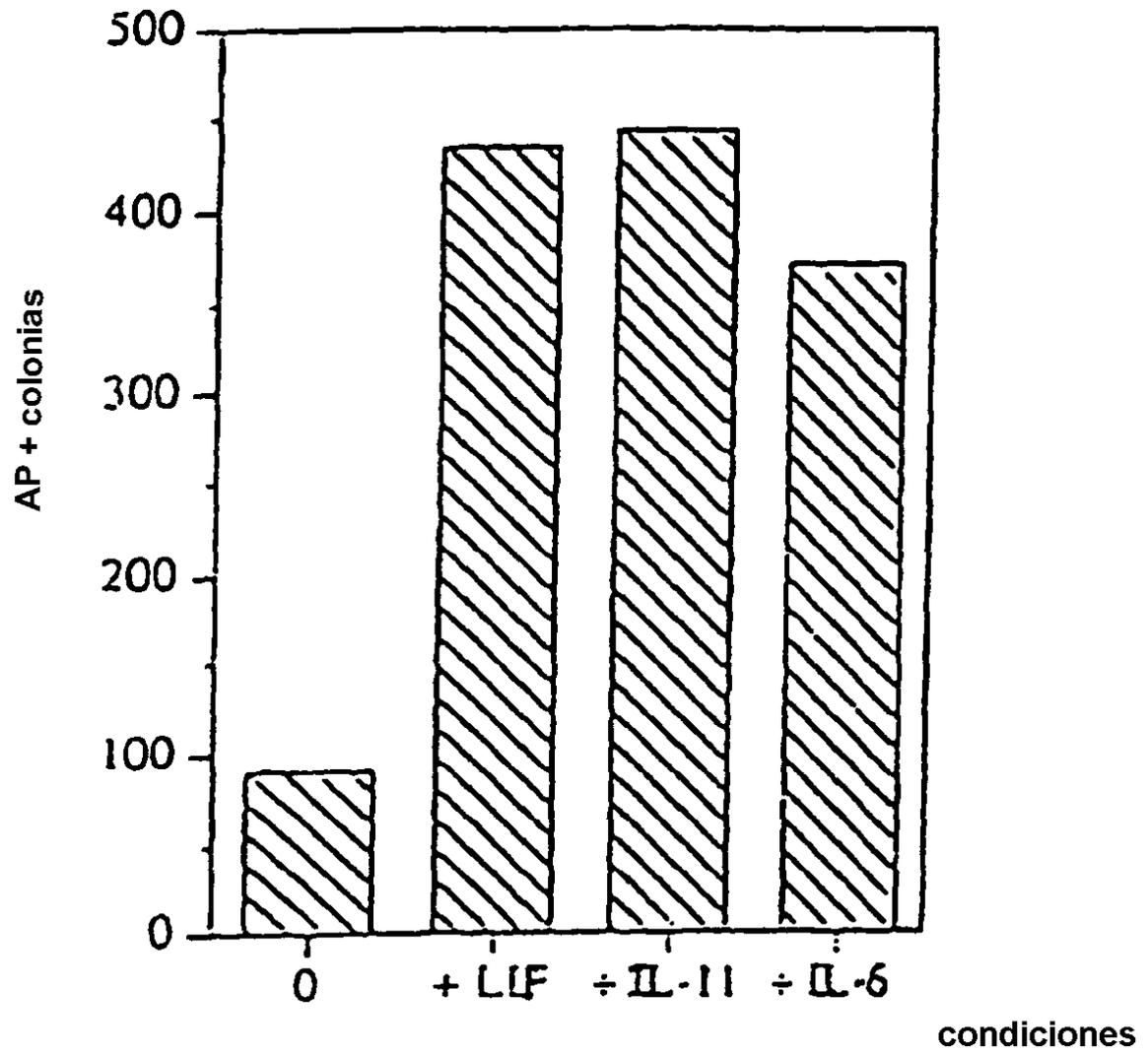
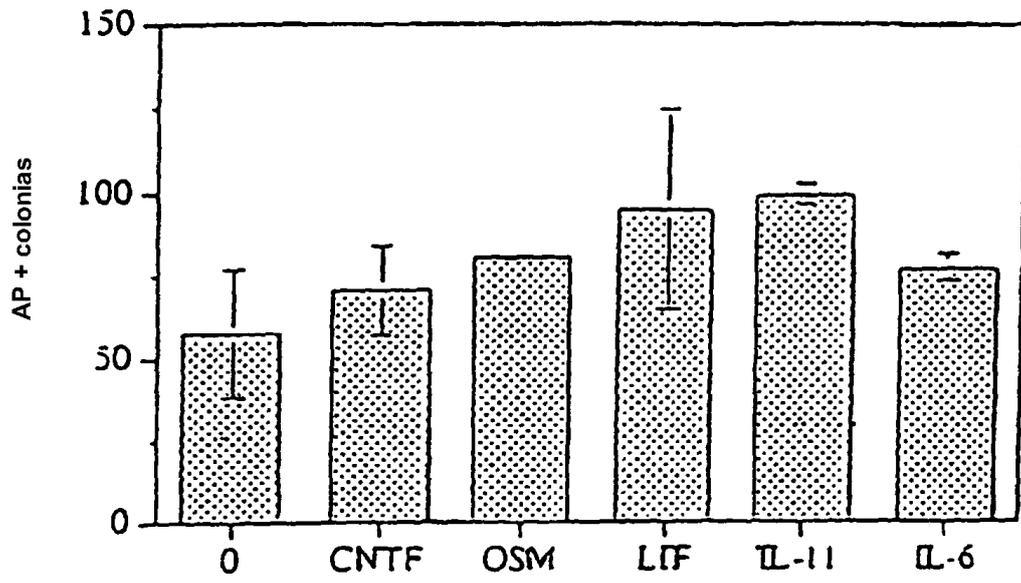
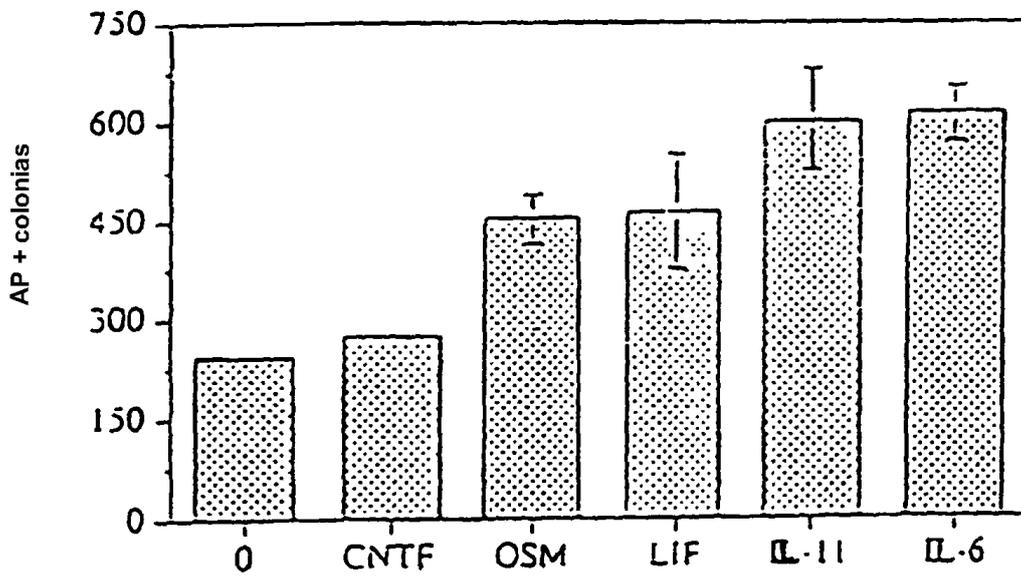


Figura 3



A



B

Figura 4

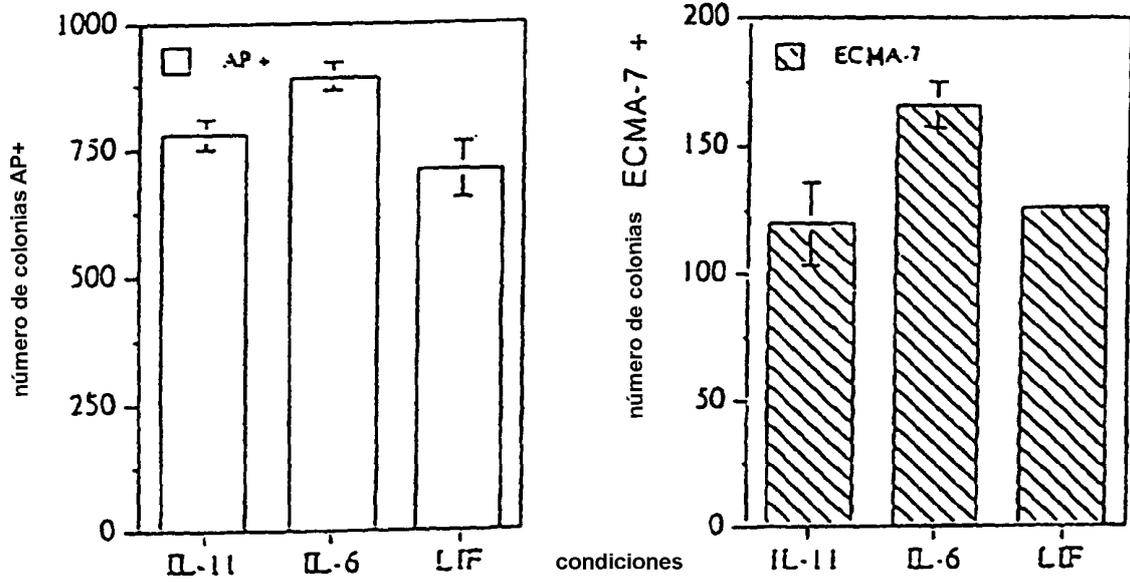


Figura 5

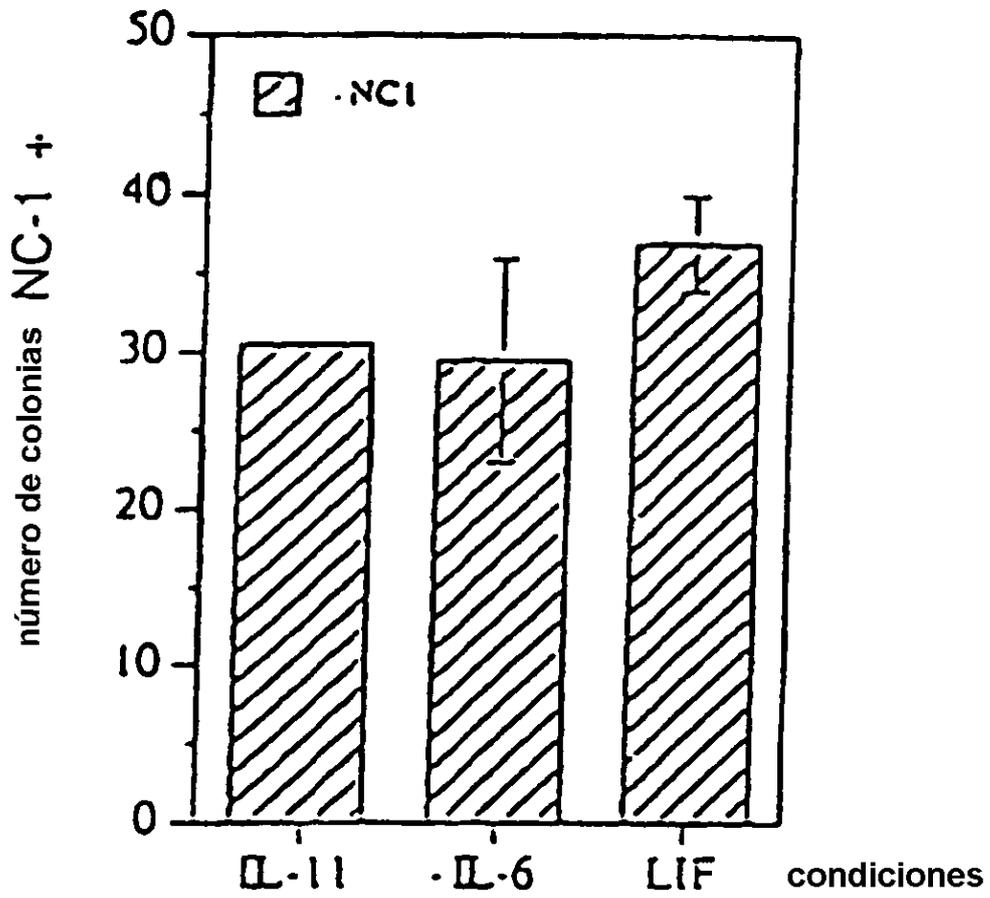


Figura 6

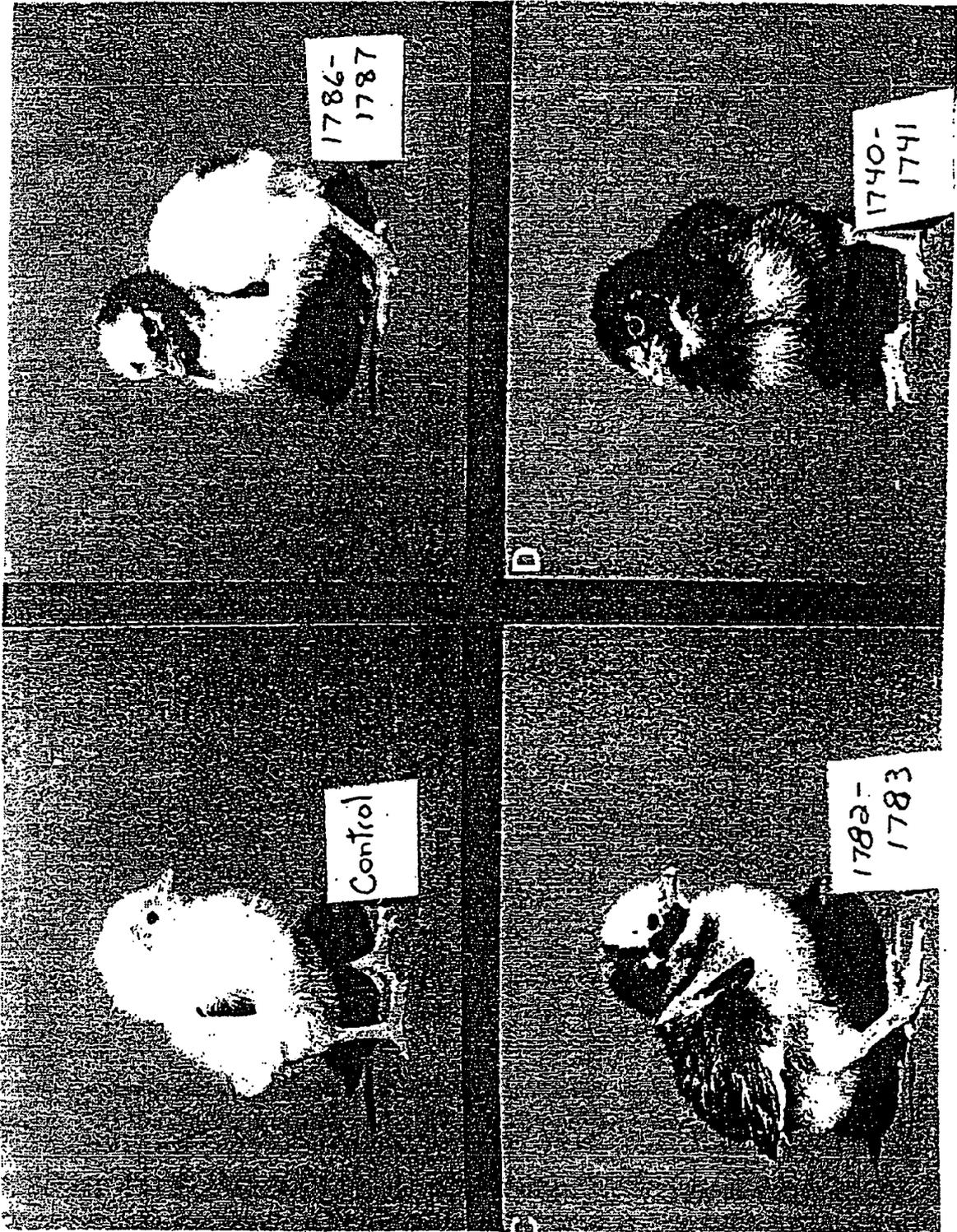


Figura 7