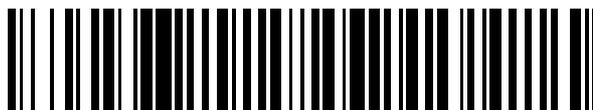


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 133**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A01K 67/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2003 E 03785241 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1539981**

54 Título: **Expresión específica de tejido de proteínas exógenas en pollos transgénicos**

30 Prioridad:

09.08.2002 US 216098

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

29.08.2013

73 Titular/es:

**SYNAGEVA BIOPHARMA CORP. (100.0%)
128 Spring Street, Suite 520
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**ZHU, LEI;
WINTERS-DIGIACINTO, PEGGY y
ETCHES, ROBERT**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 421 133 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

Expresión específica de tejido de proteínas exógenas en pollos transgénicos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la expresión de proteínas en animales transgénicos y quiméricos, y tecnologías que lo posibilitan tales como ingeniería genética, transgénicos y el cultivo a largo plazo de células madre embrionarias. Las células madre embrionarias se someten a ingeniería genética con construcciones genéticas diseñadas especialmente para introducir modificaciones genéticas en aves, incluyendo la inserción de transgenes que dan expresión específica de tejido de proteínas exógenas. Las aves genéticamente modificadas de la invención expresan la proteína exógena derivada de transgén en el oviducto y la proteína se deposita en grandes cantidades en el huevo.

15 Antecedentes de la invención

Los animales modificados genéticamente ofrecen el potencial de tremendos avances en la producción de valiosos productos farmacéuticos en las células de dichos animales. No obstante, la producción de animales modificados genéticamente implica obstáculos técnicos significativos que solo se han superado para algunas especies. La capacidad de incorporar modificaciones genéticas en el ADN permanente de una especie requiere varias tecnologías distintas que se deben desarrollar para cada especie modificada genéticamente. Un abordaje para alterar las características genéticas y físicas de un animal es usar células madre embrionarias que contribuyen al fenotipo de un animal cuando se inyectan en una forma embrionaria del animal. Las células madre embrionarias tienen la capacidad de contribuir al tejido de un animal nacido a partir del embrión receptor y de contribuir al genoma de un organismo transgénico creado mediante cruces de quimeras.

Se ha comprometido un significativo gasto de tiempo y recursos al estudio y desarrollo de líneas de células madre embrionarias, la manipulación del genoma de las células y las técnicas de cultivo celular que permiten que dichas células sometidas a ingeniería se mantengan en cultivo. Aunque se han realizado muchos intentos, la capacidad para mantener la pluripotencia de las células madre embrionarias sometidas a ingeniería en cultivo solo se ha conseguido para algunas especies, principalmente ratones. Para otras especies, la promesa de ingeniería genética en transgénicos para la producción de proteínas se ha frustrado por la ausencia de cultivos prolongados de células madre embrionarias sostenibles.

Si hubiera fácilmente disponibles cultivos sostenibles de células madre embrionarias y fueran sensibles a ingeniería genética al tiempo que mantienen su pluripotencia, dispondríamos de una amplia aplicación de nuevas tecnologías. Dado que las células madre embrionarias contribuyen al ADN permanente de un animal, las características fisiológicas del animal del que deriva la célula madre embrionaria se pueden transferir a un embrión receptor incorporando estas células en el animal receptor en estado embrionario. Esto ofrece dos ventajas principales: primera, el fenotipo de un animal del que derivan las células madre embrionarias se puede transferir selectivamente a un embrión receptor. Segunda, como se ha indicado anteriormente, cuando los cultivos de células madre embrionarias son particularmente estables, el genoma de las células se puede modificar genéticamente para introducir modificaciones genéticas en un embrión receptor en el que se introducen las células.

En determinados casos, las células madre embrionarias se pueden someter a ingeniería con un transgén que codifica una proteína exógena. El transgén es una construcción genética que contiene ADN que actúa como el plan de acción para la producción de una proteína valiosa y contiene suficiente codificación y elementos reguladores para permitir la expresión de la proteína en el tejido del animal que se crea a partir de la inserción de las células madre en un embrión receptor. En muchos casos, la expresión de una proteína es particularmente valiosa porque la proteína se puede recoger y aislar del animal transgénico. No obstante, la recolección de una proteína valiosa de los tejidos de un animal normalmente requiere que la expresión se limite a determinados tejidos específicos que facilitan la recolección de la proteína expresada. Por ejemplo, en vacas, la expresión de una proteína en la leche permitiría la fácil recolección de la proteína simplemente recogiendo la leche de la vaca y separando la proteína exógena. En pollos, la producción sólida de proteínas en la clara del huevo también proporciona un vehículo atractivo para la expresión de proteínas exógenas. Si la expresión de proteínas valiosas se pudo conseguir de este modo, el animal se pudo usar como vehículo para la producción de proteínas que es superior a otros procedimientos de producción. Por tanto, un campo de investigación particularmente atractivo y un área atractiva para el desarrollo comercial es el de los animales modificados genéticamente que expresan determinadas proteínas exógenas en tejidos específicos que facilitan el aislamiento y la recolección de la proteína. La capacidad para producir proteínas exógenas en células seleccionadas específicamente de un animal es también particularmente valiosa porque la ausencia de especificidad de tejido simplemente da lugar a la expresión de la proteína en todos los tejidos de un animal. En estas circunstancias, es improbable que una cantidad significativa de la proteína se pueda separar del animal y, además, la expresión ubicua de una proteína exógena suele ser muy dañina para la salud general y el bienestar del animal.

Si un cultivo de células madre embrionarias es suficientemente estable como para permitir que un transgén se integre en el genoma de la célula madre embrionaria, un transgén que codifica la expresión específica de tejido de

una proteína se puede pasar a un organismo nuevo quimérico o transgénico mediante varias técnicas diferentes en función de la construcción específica usada como transgén. Los genomas enteros se pueden transferir mediante hibridación celular, los cromosomas intactos mediante microcélulas, los segmentos subcromosómicos mediante transferencia génica mediada por cromosoma, y los fragmentos de ADN en el intervalo de kilobases mediante transferencia génica mediada por ADN (Klobutcher, L.A. y F.H. Ruddle, *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 533-554, 1981). Los cromosomas intactos se pueden transferir a una célula madre embrionaria mediante transferencia cromosómica mediada por microcélulas (TCMM) (Fournier, R.E. y F.H. Ruddle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 319-323, 1977). El diseño específico del transgén también debe considerar el contenido de las secuencias de ADN que codifican la proteína exógena, el tejido específico al que se ha dirigido la expresión, el organismo huésped en el que se produce la expresión y la naturaleza de la proteína que se va a expresar. Dado que las proteínas que normalmente se expresan *in vivo* varían espectacularmente en lo que respecta a su tamaño, las características bioquímicas y la funcionalidad, el transgén diseñado para expresión específica de tejido debe satisfacer varios parámetros para permitir el éxito de la integración en el genoma de una célula madre embrionaria y para garantizar el éxito de la expresión en el tejido seleccionado del organismo huésped.

Como se ha indicado anteriormente, el rendimiento de las modificaciones genéticas en las células madre embrionarias para producir animales transgénicos únicamente se ha demostrado en muy pocas especies. Para ratones, se conoce bien el uso por separado de recombinación homóloga seguida de transferencia cromosómica a células madre embrionarias (ME) para la producción de descendencia quimérica y transgénica. Se han desarrollado potentes técnicas de recombinación homóloga específica de sitio o direccionamiento génico (véanse Thomas, K. R. y M.R. Capecchi, *Cell* 51: 503-512, 1987; revisión por Waldman, A.S., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 12: 49-64, 1992). La inserción del ADN clonado (Jakobovits, A., *Curr. Biol.* 4: 761-763, 1994), y la manipulación y selección de fragmentos de cromosomas mediante las técnicas del sistema Cre-loxP (véanse Smith, A. J. y cols., *Nat. Genet.* 9: 376-385, 1995; Ramirez-Solis, R. y cols., *Nature* 378: 720-724, 1995; patentes de EE.UU. 4.959.317; 6.130.364; 6.091.001; 5.985.614) están disponibles para la manipulación y transferencia de genes a células ME murinas para producir quimeras genéticas estables. Muchas de estas técnicas cuya utilidad se ha demostrado en sistemas de mamíferos estarían disponibles para su aplicación a células madre embrionarias no mamíferas si se dispusiera de los cultivos celulares necesarios y si se pudieran diseñar transgenes que dieran una expresión específica de tejido en tejidos específicos que facilitan aislamiento y recolección de la proteína exógena.

Los transgenes que permiten la expresión específica de tejido son complejos y las manipulaciones genéticas que son necesarias para incorporar los transgenes en una línea celular embrionaria requieren una extensa manipulación de las células madre embrionarias y pueden amenazar a la pluripotencia de las células madre a menos que las condiciones del cultivo se optimicen para transgénesis. Por tanto, las líneas de células madre embrionarias para usar en la transgénesis deben ser tanto estables en cultivo como mantener la pluripotencia cuando la célula ME se transfecta con una construcción genética que sea grande y lo bastante compleja para contener todos los elementos necesarios para la expresión de proteínas. Además, la construcción genética se debe expresar en la célula ME para permitir la selección de células transformadas satisfactoriamente y la célula ME debe mantener la potencia y el transgén debe permanecer viable durante la inyección en el embrión del receptor y la formación de los animales resultantes. En el animal resultante, el transgén debe expresarse de un modo eficaz en tipos específicos de tejidos individuales en los que se ha diseñado el transgén para su expresión y no deben expresarse en otros tejidos de un modo tal que la viabilidad del animal se ve comprometida. Por ejemplo, ADN que codifica transgenes derivados de elementos linfoides del sistema inmunitario podría dirigirse específicamente a su expresión en linfocitos B de un animal quimérico o transgénico. Específicamente para la expresión de proteínas valiosas, el transgén se puede diseñar para expresar la proteína en el oviducto de un modo tal que la proteína resultante se deposita en la clara del huevo. En una especie de ave, la expresión específica de tejido de las proteínas exógenas en los tipos de célula del oviducto daría un sistema biológico valioso para la producción de proteínas.

Para la producción de proteínas exógenas, los sistemas biológicos de aves ofrecen muchas ventajas, incluidos un eficiente cultivo en granjas, crecimiento rápido y producción económica. En general, los pollos y los pavos son una fuente de proteínas principal en la dieta humana. Además, el huevo de ave ofrece un diseño biológico ideal tanto para la síntesis masiva de unas pocas proteínas como para la facilidad de aislamiento y recolección del producto proteico. No obstante, la aplicación de todo el abanico de técnicas transgénicas en mamíferos a especies de aves no ha tenido éxito. Cabe destacar que todavía no se ha demostrado la transmisión a un animal vivo maduro de una modificación genética que codifique una proteína exógena introducida en una célula madre embrionaria aviar y se exprese con especificidad de tejido.

En muchos casos, las técnicas necesarias para introducir modificaciones genéticas en las células madre embrionarias, la detección selectiva de células madre embrionarias modificadas para seleccionar modificaciones celulares específicas en las que se han introducido las construcciones genéticas y la capacidad para manipular las células ME para inyectar en embriones para producir pollos transgénicos requiere al menos varias semanas para todas las etapas que se han de realizar. Para que las células madre embrionarias sean útiles en la transgénesis, el estado pluripotencial se debe mantener durante todo el periodo de tiempo hasta la inyección en un embrión y la célula ME debe incorporarse en un embrión receptor en un grado necesario para expresar cantidades significativas de la proteína exógena en el animal resultante.

Sumario de la invención

La presente invención incluye aves modificadas genéticamente que exhiben expresión inespecífica y específica de tejido de proteínas exógenas, construcciones transgénicas que permiten la expresión de proteínas exógenas, composiciones aisladas de proteínas exógenas y procedimientos relacionados. La invención usa cultivos de células ME aviares a largo plazo y técnicas especiales para producir aves modificadas genéticamente derivadas de los cultivos prolongados de células madre embrionarias, en los que el genoma de las células ME tienen integrado establemente un transgén que expresa una proteína exógena de un modo tal que la progenie de las células ME contiene el transgén. En algunas realizaciones, estas construcciones genéticas modifican el ADN de la célula ME para facilitar la expresión específica de tejido de una proteína exógena. Cuando se combinan con un embrión aviar del huésped, mediante los procedimientos descritos más adelante, las células EM modificadas producen aves modificadas genéticamente que incorporan el transgén en tejido somático específico seleccionado de los animales resultantes. Estas aves modificadas genéticamente exhiben un fenotipo derivado de células ME y expresan la proteína extraña en todos los tejidos o en un tejido seleccionado. Preferentemente, un patrón de expresión específico centra la expresión en un tejido o tipo de tejido en la exclusión sustancial de otros tejidos y facilita la concentración y recolección de la proteína.

Se describen composiciones que comprenden cultivos a largo plazo de células madre embrionarias de pollo que se han modificado genéticamente para incorporar grandes cantidades de ADN extraño y que contribuyen a los tejidos somáticos y la línea germinal de embriones receptores. La invención también incluye pollos modificados genéticamente que expresan proteína exógena en el tejido del oviducto de un modo tal que la proteína exógena se concentra en la clara del huevo. En una realización preferida, la proteína exógena es un anticuerpo monoclonal codificado por la construcción transgénica incorporada en el genoma de la célula madre embrionaria y la progenie. La secuencia del anticuerpo monoclonal está contenida dentro de un transgén que está construido específicamente para la expresión en el oviducto y que contiene promotores y secuencias reguladoras adecuadas para facilitar la expresión específica de tejido. En la realización de un ave modificada genéticamente que expresa proteínas exógenas, se describen composiciones específicas del animal y la proteína, como la clara del huevo, albumen que contiene proteínas exógenas. Para todas estas realizaciones, también se incluyen procedimientos de uso de construcciones, animales y proteínas exógenas de la invención.

30

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la morfología característica de las células ME de pollo cuando las células pequeñas crecen en una monocapa con poco citoplasma y un nucleolo prominente.

La figura 2 muestra las propiedades in vitro de células ME de pollo, específicamente la reacción con los anticuerpos SSEA-1 y EMA-1, y la expresión de la fosfatasa alcalina.

La figura 3 es un cariotipo de células ME de pollo que han estado en cultivo durante 189 días. Las células son diploides, portan 38 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas Z.

La figura 4 es polluelos Barred Rock y dos quimeras formadas inyectando células ME Barred Rock en un embrión receptor White Leghorn. Las quimeras y los Barred Rocks son indistinguibles, lo que indica que la contribución de las células ME al linaje de los melanocitos es extensa.

La figura 5 son quimeras fabricadas inyectando células ME Barred Rock en receptores White Leghorn. El par de quimeras en el panel de la izquierda exhiben contribuciones minoritarias al linaje de los melanocitos, mientras que el par del panel de la izquierda muestra contribuciones más extensas.

La figura 6 es un diagrama de la construcción plasmídica pCX/GFP/Puro usado para la transfección de células ME.

La figura 7 muestra células ME de pollo que se han transfectado con la construcción pCX/GFP/Puro y se han cultivado en presencia de puomicina. El panel superior se fotografía para revelar la fluorescencia; el panel inferior es el mismo campo visto mediante microscopía de contraste de fase.

La figura 8 es un análisis FACS de células ME de pollo no transfectadas (panel superior) y células ME de pollo que se han transfectado con la construcción pCX/GFP/Puro y se han cultivado en presencia de puomicina. El análisis muestra que sustancialmente todas las células transfectadas expresan el transgén.

La figura 9 es un análisis de tipo Southern de células ME que se han transfectado con la construcción pCX/GFP/Puro. La diferencia en la localización de la sonda en las preparaciones de ADN digerido con BamH1, EcoR1 y una combinación de las dos endonucleasas indica que el transgén se ha incorporado en el genoma en sitios diferentes en las líneas celulares TB01 y TB09.

Las figuras 10A-10D son una construcción de transgén que proporciona expresión específica de tejido en las células glandulares tubulares del oviducto de un pollo y pruebas que confirman la expresión específica de tejido. La figura

- 10A es un diagrama de un transgén denominado Ov7.5MAbdns (panel superior); (B) Una representación en diagrama de un transgén de expresión específica de tejido que contiene secuencias de ADN derivadas del promotor de ovoalbúmina del huésped combinado con ADN de codificación para un anticuerpo monoclonal. La figura 10B es una sección del magnum de un pollo quimérico que contiene el transgén de expresión específica de tejido que muestra la expresión de anticuerpo monoclonal de forma selectiva en células glandulares tubulares en la exclusión de otros tipos de células. Las figuras 10C y 10D son análisis RT-PCR que muestran la expresión de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal en el oviducto, en la exclusión de tejido cerebral, intestinal, de páncreas y muscular de las quimeras.
- 5
- 10 La figura 11 es el análisis de PCR genómico de células MEp transfectadas con BAC-A.
- La figura 12 es un análisis de tipo Southern de quimeras fabricadas con células MEp transfectadas con pCX/GFP/Puro.
- 15 La figura 13 es una fotografía de un pollo quimérico fabricado con células MEp transfectadas con pCX/GFP/Puro en luz fluorescente (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha). La fluorescencia verde se puede observar en los ojos y el pico, lo que confirma que las células ME transfectadas contribuyen a estos tejidos.
- La figura 14 es una fotografía de un pollo quimérico con células MEp transfectadas con pCX/GFP/Puro con luz fluorescente. La fluorescencia verde en la cavidad bucal, las patas y los pies, lo que confirma que las células ME transfectadas contribuyen a estos tejidos.
- 20
- La figura 15 es una fotografía de un pollo quimérico fabricado con células MEp transfectadas con CX/GFP/Puro en luz fluorescente (panel de la derecha) y luz blanca (panel de la izquierda). Se puede observar fluorescencia verde en los huesos y en las células en la pulpa de las plumas de las alas primarias emergentes, lo que confirma que las células ME transfectadas contribuyen a estos tejidos.
- 25
- La figura 16 es una fotografía de un pollo quimérico fabricado con células MEp transfectadas con pCX/GFP/Puro en luz fluorescente (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha). La fluorescencia verde se puede observar en el tejido intestinal y en el músculo de mama, lo que confirma que las células ME transfectadas contribuyen a estos tejidos.
- 30
- La figura 17 es una fotografía de un pollo quimérico fabricado con células MEp transfectadas con pCX/GFP/Puro en luz fluorescente (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha). La fluorescencia verde se puede observar en los músculos de las patas, lo que confirma que las células ME transfectadas contribuyen a estos tejidos.
- 35
- La figura 18 es una fotografía de un pollo quimérico fabricado con células MEp transfectadas con pCX/GFP/Puro en luz fluorescente (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha). La fluorescencia verde se puede observar en el páncreas, lo que confirma que las células ME transfectadas contribuyen a estos tejidos.
- 40
- La figura 19 muestra la correlación entre estimaciones del quimerismo derivadas de puntuación del nivel de fluorescencia en la piel y los tejidos de la cresta y derivadas de puntuación de la pigmentación en negro del polluelo en el momento de la salida del cascarón.
- 45
- La figura 20 es una fotografía del alantoides de un embrión quimérico formado a partir de células MEp transfectadas con CX/GFP/Puro en luz fluorescente (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha). La fluorescencia verde se puede observar en el alantoides, lo que demuestra las células ME contribuyen a este tejido.
- La figura 21 es un resumen de los datos de FACS de quimeras fabricadas con células no transfectadas (control), quimeras fabricadas con células ME que se transfectaron con CX/GFP/Puro y se estimó que contenían < 5 % de células derivadas del donante mediante pigmentación de las plumas, quimeras fabricadas con células ME que se transfectaron con CX/GFP/Puro y se estimó que contenían > 5 % y < 10 % de células derivadas de donante mediante pigmentación de las plumas, quimeras fabricadas con células ME que se transfectaron con CX/GFP/Puro y se estimó que contenían >10 % y <30 % de las células derivadas del donante mediante pigmentación de las plumas, quimeras fabricadas con células ME transfectadas con CX/GFP/Puro y se estimó que contenían > 30 y <75 % de células derivadas del donante mediante pigmentación de las plumas y quimeras fabricadas con células ME transfectadas con CX/GFP/Puro y se estimó que contenían > 75 % de células derivadas del donante mediante pigmentación de las plumas. Las células se prepararon como se describe en el texto a partir de hígado, cerebro y músculo. El número medio de células fluorescentes detectadas por encima del umbral de autofluorescencia se muestra en el panel de la izquierda; el número medio de células fluorescentes detectadas por encima del umbral M2, que es un orden de magnitud mayor que el umbral de autofluorescencia se muestra en el panel de la derecha.
- 50
- 55
- 60
- La figura 22 es un ejemplo de un análisis FACS de células preparadas a partir de cerebro de una quimera fabricada con células ME no transfectadas (panel superior) y quimeras fabricadas con células transfectadas con CX/GFP/Puro (panel inferior). Sustancialmente todas las células de las quimeras fabricadas con células transfectadas muestran un nivel de fluorescencia que es superior al de las células del ave control, lo que indica que la contribución de las
- 65

células ME del donante al tejido cerebral de la quimera es extensa.

La figura 23 es un ejemplo de un análisis FACS de células preparadas a partir de músculos de las patas de una quimera fabricada con células transfectadas con CX/GFP/Puro. La pata derecha de esta quimera era verde a simple vista, lo que indica una contribución sustancial a este tejido. Se mostró que una preparación de células del músculo de la pata fluorescente contenía células principalmente fluorescentes mediante análisis FACS (panel inferior). La pata izquierda de la quimera era de color normal y se demostró que una preparación de estas células contenía células no fluorescentes mediante análisis FACS. Estos datos muestran que el quimerismo en tejidos dentro el mismo animal puede recibir diferentes contribuciones de las células ME del donante.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se derivan líneas celulares de ME de pollo a partir de embriones en el estadio X que tienen un núcleo grande y contienen un nucleolo prominente (figura 1). Se confirma que estas células son células madre embrionarias de pollo (MEp) mediante la morfología tras el cultivo prolongado y para dar quimeras cuando se inyectan en embriones receptores. Además, las células ME permiten un alto grado de contribución a los tejidos somáticos como se determina mediante el extenso quimerismo de las plumas. Todavía más, se demuestra que estas células madre embrionarias se transfectan con transgenes portadores de ADN que codifican una proteína exógena. Las células ME integran de forma estable el transgén y expresan el transgén para permitir la selección de las células transformadas. Estas células transformadas son capaces de formar quimeras en las que una proteína exógena codificada por el transgén está presente en los tejidos seleccionados de la quimera. Las células derivadas de la quimera expresan la proteína exógena codificada por el transgén. En una realización particularmente preferida, una proteína exógena codificada por el transgén se expresa en un tejido específico o en tipos de tejidos específicos de acuerdo con la proteína codificada por el transgén. La progenie de células madre embrionarias derivan de células ME que se diferencian en fenotipos celulares no ME tras la introducción de las células ME en el embrión receptor y la formación de una quimera. Un pollo modificado genéticamente es la progenie de una quimera que se ha producido a partir de células ME de pollo portadoras de un transgén que se integra de forma estable en el genoma cuando las células derivadas de las células ME transgénicas se han incorporado en la línea germinal.

La expresión amplia de un transgén en tejido somático se demuestra mediante la expresión en tejidos extraembrionarios y somáticos. El análisis del contenido en proteínas de los huevos de animales modificados genéticamente demuestra la expresión selectiva en la clara de huevo de las proteínas exógenas codificadas por el transgén obtenidas a partir de transgenes y usando técnicas de la presente invención. La expresión específica de tejido se demuestra mediante la expresión que está sustancialmente confinada a un órgano, tejido o tipo de célula.

Ejemplo 1. Derivación de células madre embrionarias de pollo (células MEp)

Las células ME de pollo derivaron de uno de dos cruces: Barred Rock X Barred Rock o Barred Rock X Rhode Island Red. Estas razas se seleccionaron obteniendo un marcador de plumas cuando se analiza el potencial de desarrollo de células MEp. Las células MEp se inyectan en embriones de White Leghorn, que son homocigotos dominantes en el locus blanco dominante. Los pollos quiméricos resultantes de la inyección de estas células ME muestran plumas negras a partir de células MEp y plumas blancas del embrión receptor.

El establecimiento inicial del cultivo de células MEp se inició de acuerdo con el protocolo descrito en el documento USP 5.565.479. En el estadio X, el embrión es un disco redondo pequeño, que consiste en aproximadamente 40.000-60.000 células, situado sobre la superficie de la yema. Recuperando el embrión se coloca un anillo de papel sobre la membrana de la yema, exponiendo el embrión en el centro. La membrana de la yema se corta alrededor del anillo, que después se saca de la yema. El embrión, unido al lado ventral del anillo, se coloca bajo el microscopio y el área pelúcida se aísla del área opaca usando un bucle fino.

Tabla 1: Líneas celulares de MEp derivadas de células de alimentación STO o un inserto de poliéster en medio CES-80. Los cultivos se iniciaron a partir de embriones solos y una combinación de ellos.

Línea celular	Embrión de donante	Sustrato usado derivando células MEp	Variable de la línea celular
009	combinación	STO	cultivada durante 3 meses, inyectada y crioconservada
029	combinación	inserto	cultivada durante más de 3 meses, inyectada y crioconservada
31	combinación	STO	inyectada a 4 días
36	combinación	STO	inyectada a 13 días
50	combinación	STO	cultivada durante más de 8 meses, inyectada y crioconservada
63b	combinación	inserto	cultivada durante 3 meses y crioconservada
671	solo	inserto	inyectada a los 45 días de cultivo

307	combinación	STO	inyectadas a los 15 días y fijadas para tinción
314	combinación	STO	cultivada durante más de 3 meses, inyectada y crioconservada
317	combinación	STO	inyectada a los 12 días y fijada para tinción
324A	solo	inserto	cultivada durante más de 6 meses e inyectada
328	solo	inserto	cultivada durante más de 6 meses, inyectada y crioconservada
329	solo	inserto	cultivada durante 5 meses, inyectada y crioconservada
330	solo	inserto	cultivada durante 3 meses y crioconservada
331	solo	24 w inserto	cultivada durante más de 3 meses y terminada
332	solo	96 w STO	cultivada durante 3 meses y crioconservada
333	solo	12 w inserto	cultivada durante más de 3 meses y terminada
334	solo	12 w inserto	cultivada durante más de 3 meses y terminada
335	solo	96 w inserto	cultivada durante más de 3 meses y terminada

Los embriones se dispersan mecánicamente en una suspensión de células únicas y se siembran en una capa alimentadora confluyente de células STO inactivadas mitóticamente a una concentración de 3×10^4 células/cm². El medio de cultivo de MEp consiste en DMEM (20 % de medio fresco y 80 % de medio acondicionado) suplementado con 10 % de FCS, 1 % de pen/estrep.; glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, 1X nucleósidos, 1X aminoácidos no esenciales y β-mercaptoetanol 0,1 mM. Antes de usar, el medio DMEM se acondiciona en células de hígado de rata Buffalo (BRL). Brevemente, después de cultivar las células BRL hasta confluencia, se añade medio DMEM que contiene 5 % de suero y se acondiciona durante tres días. El medio se elimina y un nuevo lote de medio se acondiciona durante tres días y se repite. Los tres lotes se combinan y se usan elaborando el medio de MEp. Las células ME de pollo se hacen visibles 3-7 días después de la siembra de las células blastodérmicas. Estas células MEp eran morfológicamente similares a las células MEM; las células eran pequeñas con un núcleo grande y un nucleolo pronunciado (véase la figura 1).

Las características de crecimiento de las células MEp son diferentes de las células MEM, que crecen en colonias redondas estrechas con bordes lisos y células individuales que son difíciles de distinguir. Las células ME de pollo crecen en colonias en monocapa con células individuales claramente visibles. Las colonias fuertes suelen ser el primer signo de diferenciación en un cultivo de MEp.

Analizando los marcadores de pluripotencia de las células derivadas en cultivo, las células se fijaron y tiñeron con SSEA-1 (Solter, D. y B. B. Knowles, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 5565-5569, 1978), EMA-1, que reconocen epítomos en células germinales primordiales en ratones y pollos (Hahnel, A.C. y E. M. Eddy, Gamete Research 15: 25-34, 1986) y fosfatasa alcalina (AP) que también se expresa en células pluripotenciales. Los resultados de estos ensayos, que se muestran en la figura 2, demuestran que las células ME de pollo expresan fosfatasa alcalina y los antígenos reconocidos por SSEA-1 y EMA-1.

Aunque las células MEp son visibles después de usar el protocolo anterior, dichos cultivos no se pueden mantener más tiempo que unas pocas semanas. Se iniciaron varias modificaciones en las condiciones de cultivo, como se trata más adelante, que condujeron a la derivación de 19 líneas celulares (tabla 1) en 14 de las cuales se analizó el potencial de desarrollo mediante inyección en embriones receptores. Once de las 14 líneas celulares contribuyeron al embrión del receptor, como determina la pigmentación de las plumas (ver la tabla 2 más adelante). Este protocolo da cultivos sostenidos de células pluripotenciales que expresan un fenotipo de células madre embrionarias. En cualquier punto, las células se pueden crioconservar y cuando se inyectan en embriones receptores comprometidos tienen el potencial de contribuir sustancialmente a los tejidos somáticos (ver los ejemplos 3 y 5 más adelante).

Tabla 2: Número de pases y tiempo en cultivo de líneas de células madre embrionarias derivadas de embriones solos o combinados. Frecuencia y extensión de quimerismo somático tras la inyección de estas células MEp en receptores en estadio X.

Línea celular	Embrión de donante	Número de pase	Tiempo en cultivo (días)	Nº de Embriones inyectados	Nº de quimeras	Nº analizado	% de quimeras	Extensión del quimerismo ¹ (%)
31	combinación	0	4	15	2	7	28.5	1-5
317	combinación	4	12	29	2	10	20	25-65
36	combinación	1	13	24	1	5	20	15

ES 2 421 133 T3

307	combinación	4	15	21	1	6	17	5
330	solo	6	33	11	3	8	25	5-50
63b	combinación	11	72	36	4	21	19	1-10
67l	solo	3	45	28	0	15	0	-
324A	solo	10	65	25	0	15	0	-
009	combinación	20	61	27	0	9	0	-
329	solo	3	15	31	8	17	47	3-75
329		6	25	30	9	19	47	3-95
329		6	28	26	1	12	8	23
329		11	49	10	1	4	25	60
029	combinación	4	33	40	9	27	33	5-80
029		9	37	40	4	15	27	4-15
328	solo	6	56	19	4	11	36	10-80
328		12	98	33	7	22	32	5-50
314	combinación	17	52	30	2	5	40	5-65
314		15-17	53	29	1	4	25	30
314		17	55	37	3	15	30	3-80
314		16	65	27	2	11	18	5-40
314		14	61	25	0	13	0	-
314		16	65	32	3	14	21	10-60
314		20	61	30	4	5	80	4-50
314		21	67	30	2	11	18	5-15
314		21	71	8	0	2	0	-
50	combinación	7	53	35	7	23	30	4-65
50		14	106	36	3	21	14	10-30

¹La extensión del quimerismo se determinó mediante la proporción de plumas negras.

5 Como ocurre con el ratón, las células madre embrionarias de ave, que en ocasiones se denominan células germinales embrionarias, derivan de varias capas alimentadoras, entre las que se incluyen STO, STO-snl y otras que están disponibles fácilmente. El factor inhibidor de la leucemia (FIL) producido por estas alimentadoras y la adición de suero bovino fetal contribuye al mantenimiento de las células ME en un estado indiferenciado. En una realización preferida de la presente invención, los cultivos de células ME de pollo se inician en una capa alimentadora STO. Las células STO se cultivan hasta la confluencia, se tratan con 10 µg/ml de mitomicina durante 3-4 horas, se lavan, se digieren con tripsina y se siembran en placas recubiertas con gelatina a 4×10^4 células/cm².
 10 Las células MEP parecen crecer más rápidamente cuando la alimentadora de las células STO es más escasa. Reducir la concentración de células alimentadoras de STP a entre 10^3 y 10^5 , y, preferentemente, por debajo de 10^4 células/cm², facilita la derivación y la propagación de células MEp. No obstante, cuando se usan fibroblastos embrionarios de pollo y fibroblastos primarios de ratón con alimentadores, no se obtuvieron células MEp. Asimismo, cuando las células de MEp previamente establecidas se sembraron en estas alimentadoras, todas las demás se diferenciaron en 1 semana.

El cultivo de células MEp en insertos sintéticos, tales como membranas poliméricas (Costar, de tipo Transwell) en ausencia de alimentadoras evita la contaminación del embrión receptor con células alimentadoras cuando se inyectan las células ME. Como muestran las tablas 3 y 4, el cultivo de los insertos, en lugar de las alimentadoras STO, facilita la derivación de células MEp y los insertos se pueden usar para la derivación inicial. No obstante, tras crecer inicialmente con rapidez en los insertos, la actividad mitótica de las células ME disminuye tras 4-6 semanas de cultivo. Extendiendo el cultivo, las células se tienen que transferir a una alimentadora de células STO.

25 Tabla 3: Establecimiento de células MEp de embriones únicos en insertos o en capa alimentadora de células STO (10^4 células/cm²).

Sustrato	Nº de cultivos iniciados	Nº de líneas celulares obtenidas
Alimentadora STO	56	3 (5 %)
inserto	45	7 (16 %)

Tabla 4: Establecimiento de células MEp de embriones combinados en capa alimentadora de células STO o en un inserto sintético.

Sustrato	Nº de cultivos iniciados	Nº de líneas celulares obtenidas
Alimentadora STO	73	7 (9,5 %)
inserto	17	2 (12 %)

5 Los datos de las tablas 3 y 4 muestran que las células alimentadoras embrionarias de pollo y los fibroblastos fetales primarios de ratón no respaldan la derivación o el cultivo de las células MEp. Una alimentadora de células STO respalda la derivación y el crecimiento, pero únicamente cuando está presente en una concentración limitada de entre 10^3 y 10^5 células STO, pero, preferentemente en la presente realización, a una concentración inferior a, o adecuadamente, 10^4 células/cm². Una capa alimentadora STP densa altera el crecimiento de las células MEp, mientras que la concentración especificada de las células STP proporciona factores necesarios para la proliferación de células ME. Cuando las células están sostenidas sobre un periodo de cultivo extendido y continúan expresando un fenotipo de células madre embrionarias y se diferencian en fenotipos de células madre no embrionarias in vivo, se denominan "progenie de las células ME".

10 El medio de cultivo de células MEp consiste en 80 % de medio acondicionado y preferentemente contiene cierto medio acondicionado BRL con factores necesarios para la derivación y el crecimiento de células MEp. A una concentración del 50 %, el crecimiento de las células MEp no es tan fiable como en el 80 % del medio acondicionado. Cuando el porcentaje del medio acondicionado se reduce a menos del 50 %, el crecimiento de las células MEp se ve afectado, como se pone de manifiesto mediante un incremento en las células diferenciadas y, a una concentración del 30 % o menos, las células MEp se diferencian en 1 semana. Este medio acondicionado hallado necesario para la derivación y el mantenimiento de las células MEp no mantiene MEm pero produce su diferenciación.

15 El suero bovino fetal es un componente preferido del medio celular ME de acuerdo con la presente invención y contiene factores que conservan células MEp en un estado indiferenciado. No obstante, también se sabe que el suero contiene factores que inducen la diferenciación. Los lotes de suero disponibles comercialmente son analizados rutinariamente por los usuarios determinando su potencial conservando las células ME en un estado indiferenciado. El suero usado para los cultivos de células MEp se sabe que difiere del suero usado para cultivos de células ME de ratón. Por ejemplo, el suero usado para el cultivo de células ME de ratón que es pobre en citotoxinas y en la concentración de hemoglobina, que se sabe que mantiene las células ME de ratón en un estado indiferenciado, no avaló el crecimiento sostenido de las células ME de pollo.

20 Por tanto, el suero que se va a usar en células ME de pollo no se analizará en células ME de ratón determinando la idoneidad como componente del medio, pero sí deberá evaluarse en células ME de pollo. Para ello, los cultivos de células ME de pollo se dividen en dos y se usan analizando cada nuevo lote de suero. El nuevo lote analizado debe respaldar claramente el crecimiento de las células ME de pollo cuando se analizan empíricamente.

25 Las diseminaciones de los cromosomas de pollo requieren técnicas de evaluación especiales diferentes de las de los ratones, ya que el complejo cariotipo que consiste en 10 macrocromosomas, 66 microcromosomas y un par de cromosomas sexuales (ZZ en machos y ZW en hembras). Las células MEp a largo plazo de la presente invención mostradas en la figura 3 se analizaron tras 189 días de cultivo y se crioconservan dos veces. En referencia a la figura 3, exhibieron un cariotipo normal con 10 macrocromosomas, 2 cromosomas Z y 66 microcromosomas.

30 Las células ME de pollo se crioconservan en 10 % de DMSO en medio. Después de descongelar e inyectar varias líneas celulares en embriones receptores, se obtienen quimeras somáticas, lo que indica que las células MEp mantienen su potencial de desarrollo durante el procedimiento de crioconservación.

Ejemplo 2. Inyección de células madre embrionarias de pollo en embriones receptores

35 Permitiendo el acceso al embrión en un huevo recién puesto, el cascarón debe romperse, lo que inevitablemente lleva a una reducción de la tasa de eclosión al final del periodo de incubación de 21 días. El consenso ha sido efectuar un pequeño orificio (de un diámetro menor de 10 mm) en un lateral del huevo a través del cual se manipula el embrión, y volver a cerrar con cinta, un cubreobjetos de vidrio, una membrana de la cáscara o una pieza de cáscara. Aunque es relativamente sencillo de realizar, este procedimiento de "apertura de una ventana" ha producido una mortalidad de los embriones de entre el 70 y el 100 %. Se puede mejorar el acceso al embrión y aumentar la supervivencia y la eclosión de los huevos si el embrión se transfiere a cáscaras de huevo sustitutas

incubando hasta la eclosión usando dos cubiertas diferentes y un procedimiento (adaptado de Callebaut) (Callebaut, Poult. Sci 60: 723-725, 1981) y (Rowlett, K. y K. Simkiss, J. Exp. Biol. 143: 529-536, 1989), que se incorporan específicamente en el presente documento por referencia con esta técnica, la tasa de eclosión media es de aproximadamente un 41 % (intervalo 23-70 %) con 191 pollos eclosionados de 469 embriones en los que se han inyectado células MEp.

La incubación de los embriones tras la inyección de células ME del donante en embriones receptores se puede dividir en dos partes que comprenden el Sistema A y el Sistema B, como se describe más adelante:

- 10 El Sistema A cubre los primeros tres días de desarrollo tras la puesta del huevo. Los huevos fértiles que contienen los embriones receptores se emparejan con huevos de 3 a 5 gramos más pesados. En el polo indicado, se corta una ventana de 32 mm de diámetro, se extraen los contenidos y el embrión receptor de la yema, junto con la albúmina que la rodea, se transfiere cuidadosamente a la cáscara sustituta.
- 15 Las células se captan con una pipeta de vidrio estéril con la punta finamente afilada y se pasan a un aspirador de boca equipado con un filtro de 2 micrómetros. La abertura de la pipeta puede tener un diámetro de 50 a 120 micrómetros y posee un bisel de 30°. El embrión se visualiza con un aumento bajo y con luz azul. Las células ME de pollo se digieren con tripsina y se forma una única suspensión celular, y entre aproximadamente 2.000 y 26.000 células, y, preferentemente, aproximadamente 20.000 células, se inyectan en un embrión. Las células se sueltan suavemente en el espacio por debajo o por encima del embrión, es decir en la cavidad sub-embionaria o entre la superficie apical del área pelúcida y la capa perivitelina (membrana de la yema), preferentemente en la cavidad subterminal. Se añade albúmina adicional obtenida de huevos fértiles frescos y la cáscara se sella con una película de plástico Saran Wrap.
- 25 El Sistema B cubre el periodo desde el día tres hasta la eclosión. Al tercer día de la incubación, el embrión ha alcanzado aproximadamente el estadio 17 (H y H). Se ha transportado agua desde la albúmina a la cavidad sub-embionaria, lo que ha hecho que la yema aumente de tamaño y se convierta en muy frágil. Los contenidos de la cáscara del Sistema A se transfieren con mucho cuidado a una segunda cáscara sustituta (normalmente un huevo de pavo) de 30 a 35 gramos más pesado que el huevo original. Se añaden penicilina y estreptomina evitando la contaminación bacteriana y la ventana de 38 a 42 mm abierta en el polo como se sella con una película de plástico. Esta cáscara más grande permite que haya un espacio aéreo artificial. A los 18 o 19 días de incubación, los cultivos de embriones se transfieren a incubadoras de mesa para una observación de cerca. A medida que se establece ventilación pulmonar, periódicamente se realizan orificios en la película de plástico permitiendo la entrada de aire del ambiente en el espacio aéreo. Aproximadamente 6-12 horas antes de la eclosión, se sustituye el plástico por una pequeña placa de Petri que el polluelo puede apartar fácilmente durante la eclosión.

Para la incubación, se mantienen una temperatura (37,5 a 38 °C) y humedad relativa (50 a 60 %) convencionales para el embrión en las cáscaras sustitutas, pero la agitación periódica del huevo, normalmente cada hora y a 90 grados, tiene que modificarse asegurando una buena supervivencia. En el Sistema A, la agitación es a través de 90° cada 4 a 5 minutos; en el Sistema B, es a través de 40-60° cada 40-45 minutos. En ambos sistemas se mantiene la velocidad de agitación a 15-20° por minuto.

La contribución de las células MEp a las quimeras mejora si el embrión receptor se prepara mediante (1) irradiación a través de exposición a 660 radianes de irradiación gamma (2) alteración mediante extracción mecánica de aproximadamente 1.000 células del centro del embrión o combinando (1) y (2) antes de la inyección de las células MEp. En referencia a la tabla 5, la contribución de las células MEp a los tejidos somáticos aumentó sustancialmente cuando los embriones receptores estaban comprometidos, bien extrayendo las células del centro del embrión receptor o mediante exposición a irradiación. Cuando los embriones receptores se comprometen mediante una combinación de irradiación y extracción mecánica de las células, la contribución de las células MEp aumenta más, aunque las células MEp hayan estado en cultivo durante periodos de tiempo más prolongados. Algunos de los polluelos quiméricos resultantes son indistinguibles de los polluelos Barred Rock puros (fig. 4). Como muestran los datos en la tabla 5, las tasas de quimerismo además de la extensión del quimerismo por embrión aumentan después de comprometer al embrión receptor.

55 Tabla 5: Frecuencia de quimerismo somático tras la inyección de células MEp en embriones receptores comprometidos mediante diferentes procedimientos.

Tratamiento comprometiendo al embrión receptor	Nº de líneas celulares	Tiempo de las células en cultivo	Nº de quimeras	Nº de embriones y polluelos evaluados	Frecuencia del quimerismo en %	Extensión del quimerismo en las plumas (%)
Ninguno	14	4-106 días	83	347	24	26
Extracción mecánica de células	1	6 meses	34	63	54	20

Irradiación	1	6-7 meses	56	95	59	29.
Irradiación y extracción mecánica de células	1	7-8 meses	52	59	88	49

También se pueden usar embriones receptores sustancialmente más jóvenes que el estadio X produciendo quimeras usando células ME como donante. Los embriones receptores en estadio precoz se recuperan inyectando a las gallinas oxitocina induciendo la puesta del huevo prematura y los huevos fértiles se recuperan en los estados VII a IX.

Como alternativa, la recuperación de los embriones de la región del magnum del oviducto proporciona acceso a los embriones en estadio I a VI, que consiste en aproximadamente 4-250 células y permite el desarrollo de quimeras de todos los estadios embrionarios como potenciales embriones receptores.

Ejemplo 3. Quimeras somáticas de células madre embrionarias de pollo (MEp)

Demostrando la pluripotencia de las células ME de la invención, las células MEp se inyectan en embriones receptores White Leghorn. En la primera ronda de experimentos, un total de 14 líneas celulares en 28 experimentos se inyectan en embriones receptores en el estadio X (véase la tabla 2). Las células MEp se han propagado en cultivo entre 4 y 106 días y algunas líneas se han criopreservado. Las células ME de pollo se digieren ligeramente con tripsina, dando como resultado pequeños acúmulos de células MEp y se resuspenden en medio DMEM suplementado con HEPES 25 mM + 10 % de suero bovino fetal. En la cavidad subterminal del embrión receptor se inyectan de tres a cinco µl de la suspensión celular, que contiene entre 2.000 y 5.000 células. Se analizan todos los embriones que desarrollaron plumas y el veinticuatro por ciento de los embriones (83/347) son quiméricos según determina el color de la pluma. Las quimeras de plumas se obtienen de 11/14 líneas celulares. La extensión del quimerismo varió de 1-95 %, con una extensión media de 25,9 % (SD = 20,4).

En la tabla 2 se ilustra la variación en el quimerismo somático entre los experimentos realizados dentro de una línea celular y entre líneas celulares. Ejemplos de la contribución de las células ME a las quimeras se muestra en las figuras 4 y 5. En la figura 4, dos polluelos son quimeras y dos son Barred Rocks; es evidente que no hay diferencias fenotípicas entre estos polluelos, lo que indica que la contribución de las células ME a la quimera es extensa, particularmente en los linajes derivados del ectodermo. En la figura 5, las quimeras de la izquierda tienen niveles relativamente bajos de contribución de las células ME, mientras que las de la derecha tienen contribuciones intermedias.

Ejemplo 4. Transfección de las células MEp mediante lipofección y electroporación

En referencia a la tabla 6, a medio sin suero y antibióticos se transfiere una cantidad adecuada de ADN compatible con el tamaño del pocillo al que se está transfiriendo. Se añade el volumen adecuado de Superfect (Stratagene) y se mezcla con el ADN, y la reacción se deja proceder durante 5-10 minutos. Se extrae el medio y los pocillos a los que se va a realizar la transferencia se lavan con una solución de Ca/Mg sin sal. A la mezcla de ADN/superfect se añade el volumen de medio adecuado, que puede contener suero y antibióticos. Las placas se incuban durante 2-3 horas a 37 °C. Cuando se completa la incubación, el Superfect se elimina lavando las células 1-2x y se añade medio de cultivo recién preparado.

Tabla 6: Condiciones para la transfección de células ME de pollo usando Superfect.

Tamaño de la placa	Volumen de medio usado diluyendo el ADN	Cantidad total de ADN	µl de Superfect	Tiempo hasta la formación del complejo (min)	Volumen de medio añadido para la formación del complejo	Tiempo de incubación
96 pocillos	30 µl	1	5 µl	5-10	150	2-3 h
48 pocillos	50 µl	1.5	9 µl	5-10	250 µl	2-3 h
24 pocillos	60 µl	2	10 µl	5-10	350 µl	2-3 h
12 pocillos	75 µl	3	15 µl	5-10	400 µl	2-3 h
6 pocillos	100 µl	4	20 µl	5-10	600 µl	2-3 h
60 mm	150 µl	10	50 µl	5-10	1000 µl	2-3 h
100 mm	300 µl	20	120 µl	5-10	3000 µl	2-3 h

Se usa un pulsador para placas de Petri para la electroporación de células MEp que se unen a la placa en un pocillo de 35 mm de diámetro. Se extrae el medio y el pocillo se lava con una solución de sal sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺. Al pocillo se añade un ml de la solución de electroporación. Se añade ADN y el medio se mezcla suavemente. El pulsador para

placa de Petri se baja al fondo del pocillo y se libera una corriente eléctrica. (Preferentemente, la tensión varía de 100-500 V/cm y la longitud del pulso puede ser de 12-16 ms). El pulsador para placa de Petri se retira y el pocillo sometido a electroporación se deja reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras 10 minutos, se añaden 2 ml de medio y la placa se devuelve al incubador.

5 Para la transfección de las células en suspensión se extrae el medio y las células se lavan con una solución de Ca/Mg sin sal. Se añade tripsina con EDTA obteniendo una única suspensión celular. Las células se lavan, se centrifugan y se resuspenden en una solución tampón de electroporación para corrección, tal como PBS. La suspensión de células ME coloca en una cubeta estéril y a la suspensión celular se añade ADN (concentración mínima de 1 mg/ml) y se mezcla mediante pipeteo. Las células se someten a electroporación y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se extraen las células de la cubeta y se distribuyen a pocillos/placas previamente preparados. Las células se colocan en un incubador y se evalúa la transfección transitoria 24-48 horas después de la electroporación. La selección de células resistentes a antibióticos también se puede iniciar incluyendo un antibiótico tal como puromicina en el medio de cultivo.

15 En una realización preferida, la concentración de puromicina requerida seleccionando células transfectadas se calcula como una curva de titulación de muerte. Las curvas de titulación de muerte para células madre embrionarias de pollo se establecen exponiendo a las células en cultivo a concentraciones de puromicina variables de 0,0 a 1,0 µg/ml durante 10 días (tabla 7) y a concentraciones variables de neomicina de 0,0 a 200 µg/ml (tabla 8). El medio se cambia cada 2 días y se añade puromicina o neomicina recién preparada. Cuando se exponen a una concentración de 0,3 µg/ml de puromicina, las células ME estaban ausentes de todos los pocillos tras 3 cambios de medio con puromicina recién preparada durante un periodo de seis días (véase la tabla 7). Para la selección de los cultivos transfectados se usan concentraciones de puromicina de 0,3-1,0 µg/ml. Las concentraciones de neomicina de más de 40 µg/ml eliminaron todas las células MEp en 7 días (tabla 8).

25 Tras 10 días de selección, se visualizan las células MEp y se pueden escoger para su expansión posterior.

Tabla 7: Morfología de las células MEp tras la exposición a varias concentraciones de puromicina y diferentes duraciones (días tras la adición de puromicina).

Conc. de puromicina (µg/ml)	Tiempo de selección (días)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,0	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
0,1	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
0,2	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
0,25	ME	ME	ME	ME	ME	Dif.	Dif.	Dif./desap.	Dif./desap.	Dif./desap.
0,3	ME	ME	Dif.	Dif./desap.	Dif./desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.
0,4	ME	Dif.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.
0,5	Dif.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.
0,6	Dif.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.
0,7	Dif.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.
0,8	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.	Desap.

30 ME: Hay células ME presentes. Dif.: hay células ME diferenciadas. Desap.: no hay células morfológicamente reconocibles.

Tabla 8: Morfología de las células MEp tras la exposición a varias concentraciones de neomicina y diferentes duraciones (días tras la adición de neomicina).

Conc. de neomicina (µg /ml)	Tiempo de selección (días)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
10	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
20	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME

30	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME/Dif.	ES/Dif.	Dif.	Dif./desap.
40	ME	ME	ME	ME	ME/Dif.	Dif./muertas	muertas	desap.	desap.	desap.
50	ME	ME	ME	ME/Dif.	ES/Dif.	Dif./muertas	Muertas/desap.	desap.	desap.	desap.
60	ME	ME	ME	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.
100	ME/Dif.	Dif.	muertas	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.
150		muertas	muertas	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.
200		muertas	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.	desap.

La selección de células ME de pollo transfectadas y su identificación en quimeras requiere que el transgén confiera una ventaja selectiva a las células en cultivo (p. ej., resistencia a puromicina en el medio) y que produzca un producto génico identificable en las células en la quimera que derivan de las células ME. Esto se puede conseguir usando pCX/GFP/Puro que proporciona resistencia a puromicina en células MEp y produce una proteína verde fluorescente (GFP) en la mayoría, sino en todas, las células derivadas de donantes en las quimeras.

En referencia a la figura 6, se produjo PCX/GFP/Puro (figura 6) en tres etapas de clonación que implican dos intermedios antes de formar el plásmido pCX/GFP/Puro final. En la etapa 1, el casete génico resistente a puromicina dirigido por PGK (1,5 Kb) se liberó de pKO SelectPuro (Stratagene) mediante digestión con Asc I. Después, el fragmento se cortó por los extremos y se añadieron engarces de Kpn I. El fragmento resultante (GFP/Puro) se insertó en el sitio Kpn I correspondiente de pMIEM (cortesía de Jim Petite (NCSU), un vector de expresión de GFP derivado del pMIWZ de expresión de LacZ. Véase Cell Diff and Dev. 29: 181-186 (1990) produciendo el primer intermedio (pGFP/Puro). El casete PGK-Puro estaba en la misma orientación de transcripción que gfp GFP (determinado mediante digestión con BamH I y Sty I). En la etapa 2, el casete de expresión GFP/Puro dirigido por PGK (2,5 Kb) se liberó de pGFP/Puro mediante digestión doble con BamH I y EcoR I. El fragmento resultante se insertó en los sitios de BamH I y EcoR I del pUC18 (Invitrogen). Contiene sitios únicos Hind III, Pst I y Sal I en 5'. El plásmido pUC18/GFP/Puro resultante se verificó mediante digestión triple con BamH I, EcoR I y Not I. En la tercera etapa, el promotor Cx que incluye el potenciador CMV-IE de 384 pb, el promotor de la beta-actina de pollo de 1,3 kb y la porción del 1^{er} intrón se liberó de pCX-EGFP (Masahito, I. y cols., FEBS Letters 375: 125-128, 1995) mediante digestión con Sal I y EcoR I. Al fragmento se unió un engarce en 3' EcoR I (nulo)-Xmn I-BamH I y se insertó en los sitios Sal I y BamH I de pUC18/GFP/Puro. El plásmido pCX/GFP/Puro (figura 6) se verificó mediante digestión doble con BamH I y Pst I. El ADN de pCX/GFP/Puro se puede linealizar mediante digestión con Sea I para la transfección en células MEp.

La transfección y selección de células ME usando los procedimientos descritos anteriormente produjeron una población de células que crecerían en presencia de 0,5 µg de puromicina. Estas células exhibieron fluorescencia verde al examinarlas mediante microscopia de fluorescencia convencional (véase la figura 7). Cuando se examinan las preparaciones de las células ME mediante clasificación celular activada por fluorescencia, es evidente que esencialmente todas las células portan y expresan el transgén (véase la figura 8). El análisis de tipo Southern del ADN de las líneas celulares de ME transfectadas TB01 y TB09 que se digirió con BamHI, EcoRI o con ambas endonucleasas de restricción reveló el transgén en los fragmentos de ADN de varios tamaños, lo que proporciona pruebas de que el transgén se ha integrado en el genoma (véase la figura 9).

La construcción CX/GFP/Puro demuestra que transgenes de al menos 4,5 kb se pueden insertar en pollos quiméricos. Usando las células MEp descritas en el presente documento, las células ME de pollo se pueden transfectar con construcciones diferentes o más grandes. Dependiendo del diseño del transgén, el ADN que codifica una proteína exógena se puede detectar ampliamente en células somáticas del animal quimérico o transgénico resultante, es decir el endodermo, mesodermo, ectodermo y tejido embrionario adicional, o se puede diseñar expresando niveles significativos de una proteína exógena únicamente en un tejido determinado. La proteína está codificada por ADN contenido en una construcción transgénica específica de tejido. La construcción transgénica puede estar compuesta por elementos genéticos del genoma del organismo huésped y se puede seleccionar en base a una expresión, o patrones de expresión, conocida de una proteína en un tejido seleccionado. Para la expresión en un tejido concreto, se selección un gen que codifica una proteína que se expresa normalmente, y normalmente se expresa más en el tejido seleccionado, y se escogen los elementos reguladores del gen dirigiendo la expresión de la proteína exógena. Cuando se combina con secuencias de codificación de ADN para la proteína exógena, otros elementos reguladores, marcadores seleccionables etc., el transgén da expresión preferente de la proteína exógena en el tejido seleccionado. La expresión preferencial en un tipo de tejido específico se puede definir como una expresión de 3 a 4 órdenes de magnitud mayor en el tejido seleccionado en comparación con los tejidos no seleccionados.

Para la expresión proteica específica de tejido en un ave transgénica, la expresión específica de tejido está dirigida, preferentemente, a una región del oviducto que incluye el magnum, el istmo, la glándula de la cáscara o el infundíbulo. La selección del tejido individual para la expresión proteica depende del tipo de proteína que se vaya a expresar. El magnum contiene las células glandulares tubulares que expresan las proteínas predominantes de la clara del huevo, mientras que el istmo contiene células que expresan la membrana de la cáscara. La expresión de proteínas solubles está dirigida, preferentemente, a las células glandulares tubulares del oviducto seleccionando secuencias reguladoras, que normalmente comprenden un promotor de genes que expresan proteínas de la clara del huevo, preferentemente ovoalbúmina, pero incluyendo ovotransferrina, ovomucoide, lisozima, ovoglobulina G2, ovoglobulina G3, ovoinhibidor, cistatina, ovoglicoproteína, ovoflavoproteína, ovomacroglobulina y avidina. La expresión selectiva en las células glandulares tubulares, a la exclusión de la expresión en las células epiteliales se demuestra más adelante y se indica la expresión preferente distinguiendo selectividad entre los dos tipos celulares.

En el ejemplo siguiente se construye un transgén que contiene una secuencia reguladora endógena de la clara de huevo que comprende un promotor junto con un locus para inmunoglobulina exógena, con el fin de proporcionar expresión de anticuerpos específica de tejido en las células glandulares tubulares del oviducto. Las moléculas de anticuerpo expresadas de este modo se depositan después en la clara de huevo de un pollo transgénico. En esta realización, los anticuerpos codificados por cualquier gen de inmunoglobulina reorganizado se expresan específicamente en el tejido que comprende las células glandulares tubulares de la región del magnum del oviducto y se pueden aislar de las claras de los huevos. El gen de inmunoglobulina reorganizado que codifica un anticuerpo monoclonal se expresa, preferentemente, en el oviducto para la exclusión sustancial de la expresión en otros tejidos, aunque puede existir expresión en otros tejidos por encima de niveles detectables.

En esta realización, el casete de anticuerpo monoclonal bajo el control de las secuencias reguladoras de ovoalbúmina está compuesto por al menos 3,4 kb y, preferentemente, al menos aproximadamente 7,5 kb de la secuencia reguladora en 5' y puede incluir 15 kb de la secuencia reguladora en 3'. Preferentemente, la construcción incluye regiones del gen de la ovoalbúmina que flanquean los extremos 5' y 3' de la región de codificación del anticuerpo exógeno, aunque un segmento lo bastante grande de la secuencia promotora endógena de la región flanqueante en 5' puede evitar la necesidad de una región flanqueante en 3'. Las regiones de codificación de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se proporcionan en el transgén e incluyen las regiones variables, de diversidad, constantes y de unión del isotipo seleccionado. En una realización preferida, el anticuerpo está codificado por un gen de inmunoglobulina que es, característicamente, humano y contiene al menos una cadena pesada humana. Asimismo, el isotipo es, preferentemente, IgG, y, más preferentemente, IgG1.

Una construcción de transgén preferida para una construcción de anticuerpo monoclonal derivada de ovoalbúmina se proporciona en la figura 10A. Esta construcción transgénica se denomina Ov7.5 y tiene, aproximadamente, 7,5 kb de una secuencia reguladora de la clara de huevo que comprende un promotor, en esta realización específica el promotor de la ovoalbúmina, flanqueando a la secuencia de codificación del MAb en el extremo 5' y 15 kb de la secuencia promotora en 3' de la región de codificación. Las regiones de codificación comprenden las regiones variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, secuencias intrón J-C, la región constante de la cadena ligera kappa, una secuencia IRES y las regiones constantes de la cadena pesada del isotipo gamma 1. El extremo 3' de la construcción comprende un gen de GFP y un marcador seleccionable, en este caso un gen de resistencia a puromicina dirigido por el promotor CX descrito en el presente documento. Las longitudes de la secuencia del promotor de la ovoalbúmina en 3' y en 5' de la región de codificación del anticuerpo monoclonal son solo ejemplos y construcciones análogas pueden incluir 25-100 kb o más de la secuencia en 5' además de varias longitudes en la secuencia 3'. Los expertos en la técnica apreciarán que el marcador GFP solo está presente para la detección en muestras fisiológicas y se puede eliminar sin desviarse de la utilidad del transgén. El marcador de la resistencia a puromicina se puede sustituir con cualquier marcador que proporcione la capacidad para seleccionar células madre embrionarias que se transformen con éxito con el transgén. En la técnica se conocen varios tipos de marcadores seleccionables análogos y se pueden usar esencialmente de forma intercambiable con el gen de resistencia a puromicina de esta realización.

Como se ha indicado anteriormente, este anticuerpo monoclonal es solo un ejemplo de varios tipos de productos de anticuerpos monoclonales que se pueden expresar usando las construcciones transgénicas de la invención. Además, los anticuerpos monoclonales como clase de proteínas son solo un ejemplo de muchas clases de productos proteicos que se pueden expresar de un modo específico de tejido según los procedimientos y técnicas descritos en el presente documento.

En referencia a la figura 10B, una sección del magnum de quimeras de dos semanas de edad en las que la expresión del transgén Ov 7.5 se indujo mediante inyección de estrógenos muestra expresión específica de tejido de células productoras del anticuerpo monoclonal anti-dansilo derivadas de las células madre embrionarias transformadas que expresan GFP, que se muestra en verde en el panel superior de la izquierda de la figura 10B, confirma la contribución de la célula madre embrionaria transformada con el transgén Ov 7.5. En referencia al panel inferior izquierdo de la figura 10B, el anticuerpo monoclonal se tiñe de rojo en las células glandulares tubulares, mientras que las células epiteliales, que también derivan de la célula madre embrionaria donante, se tiñen de verde y no se tiñen de rojo. Esta diferencia en la tinción demuestra que la expresión de la construcción es específica de tejido y se selecciona mediante el contenido del transgén para el tipo de tejido específico. Mientras que el siguiente

ejemplo demuestra expresión específica de tejido en las células glandulares tubulares del oviducto, la demostración de la expresión en todas las células y tipos de tejido demuestra que cada uno o cualquier tejido podría elegirse para la expresión específica de célula o de tejido mediante la selección correspondiente de los componentes de la construcción transgénica y, por ejemplo, el promotor u otros elementos reguladores.

5 En el panel superior derecho de la figura 10B, todos los tipos celulares se muestran mediante tinción DAPI. En el panel inferior derecho, se superponen las tinciones demostrando que solo las células glandulares tubulares derivadas de donante expresan el anticuerpo monoclonal, mientras que las células derivadas de receptores y las células epiteliales derivadas de donante no expresan el anticuerpo monoclonal. Las figuras 10C y 10D son análisis RT-PCR que muestran que la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo monoclonal anti-dansilo se expresan de forma selectiva en únicamente el tejido del oviducto de 3 o 5 quimeras y no en el cerebro, el intestino, el páncreas o el músculo de estas quimeras por encima de los niveles detectados mediante RT-PCR.

15 Demostrando que un anticuerpo monoclonal humano de isotipo IgG podría expresarse de forma selectiva y la proteína depositada es clara del huevo, se produjo un total de 18 hembras quiméricas inyectando células MEP portadoras de la construcción Ov7.5. Analizando la expresión del transgén mediante inducción precoz de estrógenos se usaron seis quimeras de este grupo. Las 12 hembras quiméricas restantes se llevaron hasta la madurez sexual para recolectar los huevos. Nueve hembras quiméricas comenzaron la puesta a las 17-22 semanas de edad y una de estas quimeras puso huevos esporádicamente. Tres de las hembras quiméricas no habían puesto huevos a las 20 35 semanas de edad y en el momento de la autopsia se puso de manifiesto que sus gónadas estaban masculinizadas por la presencia de tejido derivado de células ME masculinas.

25 Los huevos de nueve quimeras ponedoras se recogieron y las muestras representativas de clara de huevo se prepararon mediante precipitación de sulfato amónico y se analizaron mediante ELISA. Las placas de microtitulación se recubrieron con un anticuerpo IgG anti-humano de cabra y la presencia del MAb de IgG humano en las muestras de clara de huevo se reveló mediante el anticuerpo IgG anti-humano de cabra marcado (específico de la cadena γ) para la cadena pesada y/o el anticuerpo kappa anti-humano de cabra marcado (específico de la cadena κ) para la cadena ligera. Se establecieron las curvas estándar con proteínas κ de Ig1 humana purificada. La sensibilidad del ELISA fue de 0,8 ng/ml. Como controles negativos se usaron muestras de clara de huevo de gallinas White Leghorn no transgénicas. No se detectó depósito de MAb IgG humano en los huevos de gallinas White Leghorn no 30 transgénicas (4 huevos) o de 6 gallinas quiméricas (8 huevos de la gallina nº OV11-17, 8 huevos de la gallina nº OV11-53, 6 huevos de la gallina nº OV11-73, 6 huevos de la gallina nº OV11-88, 4 huevos de la gallina nº OV12-97 y 5 huevos de la gallina nº OV13-13).

35 El depósito del MAb IgG humano se detectó en huevos de 3 gallinas quiméricas diferentes ((~1.4-6.3 ng/ml para huevos de la gallina nº OV11-13, ~2,0-2,9 ng/ml para huevos de la gallina nº OV11-37 y ~2,9-10,8 ng/ml para huevos de la gallina nº OV11-43 determinado mediante ELISA para IgH). La concentración del MAb IgG humano en huevos representativos se resume en la tabla 9. La concentración de MAb IgG humano en huevos determinada mediante ELISA para IgL fue consistentemente menor que la determinada mediante ELISA para IgH. En general, la 40 concentración determinada mediante IgL fue el 60 % de la concentración determinada mediante IgH (compárese las columnas 3 y 5 en la tabla 9). La diferencia también estaba presente en muestras enriquecidas elaboradas con proteínas κ de Ig1 humana purificada.

Tabla 9: Depósito de MAb IgG humano en huevos de quimeras.

ID del huevo	Fecha de la puesta	Nivel de IgG humana mediante ELISA de IgH (ng/ml)*	Valor de IgG corregido en clara de huevo (ng/ml)**	Nivel de IgG humana mediante ELISA de IgL (ng/ml)*
OV11-43-9	11/12/02	7,6	10,8	4,6
OV11-43-10	11/13/02	5,2	7,4	3,4
OV11-43-11	11/14/02	6,8	9,7	4,2
OV11-43-13	11/17/02	5,4	7,7	3,4
OV11-43-14	11/18/02	4,6	6,6	3,2
OV11-43.25	11/30/02	3,0	4,3	1,8
OV11-43-26	12/01/02	2,0	2,9	1,2
OV11-43-33	12/08/02	7,0	10,0	4,2
OV11-13-1	11/24/02	3,6	5,1	2,4
OV11-13-2	11/26/02	4,4	6,3	2,6
OV11-13-3	12/2/02	3,8	5,4	2,4

OV11-13-4	12/10/02	2,6	3,7	1,4
OV11-13-5	12/11/02	3,6	5,1	2,2
OV11-13-11	12/17/02	3,2	4,6	2,2
OV11-13-37	01/27/03	1,0	1,4	~0,6
OV11-37-1	12/08/02	2,0	2,9	1,2
OV11-37-2	12/11/02	2,0	2,9	1,2
OV11-37-3	01/06/03	1,4	2,0	~0,6

*Algunas muestras de clara de huevo se prepararon y sometieron a ensayo muchas veces y se realizó el promedio de los valores. **La recuperación de la preparación de muestra se estimó en un 50-70 % usando muestras de clara de huevo controles negativos enriquecidas con una cantidad conocida de proteínas κ de Igyl humana. El valor de IgG dado en la columna 4 se corrigió en base a una recuperación del 70 % de la preparación de la muestra proporcionando una estimación conservadora de la concentración de humana 4 en la clara de huevo.

La concentración de proteínas MAb IgG humano en muestras de sangre de las gallinas nº OV11-13, nº OV11-37 (que depositaron la Ig humana en sus huevos) y una White Leghorn fue inferior a la sensibilidad del ensayo (0,8 ng/ml). Estos datos son consistentes con la ausencia de expresión ectópica de Ig humana en pollos quiméricos que se observó usando RT-PCR evaluando la presencia de los transcritos de Ig humana en intestino, cerebro, páncreas y músculo en polluelos quiméricos inducidos con estrógenos (figuras Ti 10C y D). Por tanto, la construcción Ov7.5 parece liberar expresión génica específica de tejido, inducida hormonalmente y regulada por el desarrollo en gallinas quiméricas transgénicas. Además, parece que la proteína se exporta desde las células glandulares tubulares en el magnum y se deposita en la clara de huevo.

Los transgenes de expresión proteica específicos de tejido derivados de ovoalbúmina se construyeron del siguiente modo:

Se realiza una detección selectiva de una biblioteca BAC genómica de pollos (Crooijmans, R. P. y cols., Mamm. Genome 11: 360-363, 2000), (Texas A & M BAC Center) aislando una región de 46 Kb en el locus de la ovoalbúmina. Se construyeron dos vectores diferentes que tenían diferentes fragmentos del promotor de la ovoalbúmina localizado en 5' de la región de codificación del MAb. (1) Ov7.5MAb-dns: un vector de expresión de 42 kb contiene secuencias en 5' de 9,2 Kb del gen de la ovoalbúmina (incluyendo el promotor de 7,5 kb) y secuencias flanqueantes en 3' de 15,5 Kb (figura 10A). Este vector de expresión de 42 kb contiene 9,2 Kb de la secuencia en 5' del gen de la ovoalbúmina (incluyendo el promotor de 7,5 kb) y secuencias flanqueantes en 3' de 15,5 Kb. Un casete bicistrónico del anticuerpo monoclonal codifica la cadena ligera, una IRES y la cadena pesada de un anticuerpo anti-dansilo. (2) Ov15MAb-dns: el vector de expresión de 49 Kb contiene secuencias en 5' de 16,8 Kb del gen de la ovoalbúmina (incluyendo el promotor de 15 Kb) y secuencias flanqueantes en 3' de 15,5 Kb (no mostrado). El vector de expresión de 49 Kb contiene una secuencia en 5' de 16,8 Kb del gen de la ovoalbúmina (incluyendo el promotor de 15 Kb) y secuencias flanqueantes en 3' de 15,5 Kb. El casete del anticuerpo monoclonal es idéntico en ambas construcciones.

Como se ha indicado anteriormente, el gen que se va a expresar en ambos vectores es un anticuerpo monoclonal anti-dansilo híbrido de ratón-humano (MAbdns). El casete CxEGFP/CxPuro se clona en el extremo más 3' permitiendo la selección con puromicina para una transfección estable en células MEp y la fácil identificación de las células transfectadas en las quimeras. Ambas construcciones se linealizan y purifican antes de la transfección en células MEp. Las transfecciones de las células MEp se realizan con Ov7.5MAbdns y Ov15MAb usando SuperFect (Stratagene) o electroporación en pulsador de placa de Petri. Después de seleccionar con puromicina se escogieron 6 clones resistentes para su análisis molecular. La presencia del transgén se confirma mediante PCR con cebadores localizados en el casete de MAbdns, en el gen GFP y en el gen Puro. Las células ME transfectadas se usan creando aves transgénicas o quiméricas como se describe con detalle más adelante.

En otro ejemplo más, un transgén muy grande que codifica parte del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana no reorganizado se ha transfectado en células ME de pollo. Un clon del cromosoma artificial bacteriano (BAC) de 139 kilobases se co-transfectó con el marcador seleccionable pCX-EGFP-CX-puro en células MEp mediante co-lipofección del ADN circular del BAC y el ADN lineal del marcador seleccionable. El clon del BAC contiene un inserto de ADN genómico humano de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizado y contiene la región variable más en 3' (VH₆-1), y los segmentos de diversidad (D), todos los segmentos de unión (J), las regiones constantes C μ y C γ , el potenciador intrónico J y todo el ADN entremezclado entre estos elementos. También incluye el gen humano KIAA0125, un gen que codifica un ARN no traducido de función desconocida que se encuentra entre VH₆-1 y la región del segmento D. pCX-EGFP-CX-puro es un plásmido que contiene el gen de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) dirigido por el promotor CX (que consiste en un potenciador de citomegalovirus y el promotor de la β -actina de pollo) y un gen de resistencia a la puromicina dirigido por el mismo promotor. Las células MEp transfectadas con este plásmido son verdes fluorescentes y resistentes al antibiótico puromicina. La presencia del locus de la cadena pesada humana

reorganizado en las células ME transfectadas que estaban creciendo en presencia de puromicina se examinó mediante análisis PCR de la diseminación de los transgenes a lo largo de la construcción de 139 kb. Las secuencias de los cebadores usadas en el análisis PCR fueron:

V _H 6-1:	
V6-1F	AGTGTCAGGGAGATGCCGTATTCA
V6-1R	ACTTCCCCTCACTGTGTCTCTTG
D1-26:	
D1-26F	GGGCGCCTGGGTGGATTCTGA
D1-26R	GTGGCCCCTAAACCTGAGTCTGCT
D1-20:	
D1-20F	CCCGAGCACCGTCCCCATTGA
D1-20R	GTGCCGGTGATCCCTGTCTTTCTG
C _μ :	
Mu1F	GCGGGAGTCGGCCACCATCACG
Mu1R	AGCACAGCCGCCGCCCCAGTAG
C _δ :	
Delta1F	TGGGGAGAGGAGAGCACAGT
Delta1R	GGCGGGCGTAGGGGTCAGC

5

Las células ME_p se co-transfectan con el marcador seleccionable pCX-EGFP-CX-puro y el BAC CTD-2005N2, que tiene como resultado una línea celular de ME_p designada BAC-A. Se prepara el ADN genómico y se realiza una PCR usando 5 conjuntos de cebadores distintos correspondientes a marcadores a lo largo de la longitud del clon de BAC. Estos marcadores son: V_H6-1 (24 kb del extremo 5' [relativo al locus de la cadena pesada humana] del inserto genómico humano), D1-26 (83 kb del extremo), D1-20 (73 kb del extremo), C_μ (~108 kb del extremo) y C_δ (~120 kb del extremo). Solo se muestran V_H6-1, C_μ y D1-26 pero todos dieron resultados similares. Como control para la amplificación de la muestra de células ME_p, también se realiza una PCR de la β-actina de pollo. Las muestras son:

10

15

1. Células BAC-A;
2. Células STO de ratón usadas como capa alimentadora para las células ME_p (control negativo);
3. ADN de embrión de Barred Rock (la misma cepa que la línea celular ME_p parental, control negativo);
4. ADN genómico humano (control positivo);
5. Medio celular para ME_p (control negativo).

20

25

Como se muestra en la figura 11, todos los segmentos del transgén están presentes en las células ME transfectadas y seleccionadas.

Ejemplo 5. Identificación de células derivadas donantes transfectadas en quimeras

30

Las células derivadas de donantes transfectadas se detectan en quimeras mediante numerosos procedimientos. Por ejemplo, el transgén se detecta mediante análisis de tipo Southern del tejido tomado de quimeras que se identifican mediante la presencia de pigmentación negra en sus plumas. Asimismo, se obtiene ADN de embriones o de tejido de la cresta y se digiere con BamH1, EcoR1 o con una combinación de estas endonucleasas. Cuando el ADN de los tejidos en las quimeras se examina mediante análisis Southern, las bandas idénticas a las observadas en TB01, que era la célula donante usada fabricando las quimeras, eran evidentes tras la digestión con BamH1, EcoR1 o una combinación de estas dos endonucleasas de restricción (figura 12), de modo que proporciona pruebas de que la

35

quimera contiene progenie de las células ME que se introdujeron en el embrión receptor formando la quimera.

La presencia del transgén en los tejidos se detecta iluminando las quimeras con luces fluorescentes, que muestran que el transgén se expresa en el ojo y en el pico (figura 13), la cavidad bucal, las patas y los pies (figura 14) y en los huesos de las alas y en las células de la pulpa de las plumas (figura 15). El examen de los órganos internos reveló que las células ME derivadas de donante habían contribuido a los tejidos intestinales y al músculo del pecho (figura 16) y al músculo de las patas (figura 17). En otra ave se observaron contribuciones extensas al páncreas (figura 18). Estos datos proporcionan pruebas concluyentes de que la progenie de las células ME contribuyen al ectodermo, que da lugar al pico, las plumas y la piel, al mesodermo, que da lugar a los músculos y los huesos, y al endodermo, que da lugar al páncreas.

La iluminación del ave con luz fluorescente se usa puntuando las aves en una escala del 1 al 4, en la que 4 indica que toda la piel visible, los ojos y la cresta son fluorescentes. La puntuación de fluorescencia se determinó mediante cribado de varias áreas de la piel con una lámpara fluorescente y puntuando a los polluelos en una escala del 0 al 4. Una puntuación similar se usa puntuando la extensión del quimerismo estimada mediante la pigmentación de las plumas. El quimerismo de las plumas se estimó como el % de plumón negro en comparación con el plumón en la eclosión. Aproximadamente el 25 % del plumón de un polluelo Barred Rock es blanco. La puntuación máxima posible en una quimera derivada completamente de células ME derivadas de Barred Rock es, por tanto, 75 %. La correlación entre los dos que se describe mediante la ecuación $y = 0,41x + 0,25$, en la que y es la puntuación de fluorescencia y x es la extensión de la pigmentación de las plumas derivadas de células SE ME muestra en la figura 19.

El examen de la corioalantoides indicó que las células MEp también contribuyeron a los tejidos extraembrionarios (véase la figura 20). Estos datos indican que la pluripotencialidad de las células ME de pollo puede ser mayor que la de las células ME murinas, que no contribuyen al trofoectodermo.

Además del examen de tejidos vivos en las quimeras, las células se prepararon a partir de diversos tejidos y se determinó la proporción de células fluorescentes derivadas de células ME. Se extrajo el tejido (muscular, hepático o cerebral) de los pollos después de morir, se lavó con PBS eliminando la sangre u otros fluidos. La membrana externa del tejido se eliminó por disección y la muestra restante se trituró. Cada muestra de tejido se transfirió a un tubo de microcentrífuga que contenía 1 ml de 1 mg/ml de colagenasa (de tipo IV, Sigma) en medio DMEM (músculo e hígado) o medio Liebowitz L15 (cerebro) sin suero. Estos tubos se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 30-45 minutos (los tubos se invirtieron cada 10-15 minutos agitando la suspensión) y, después, los tejidos se dispersaron en suspensiones celulares únicas usando una pipeta de 100-200 µl equipada con una punta de plástico desechable y se purificaron de acuerdo con el tipo de tejido. Todas las etapas de centrifugación se ejecutaron en una microcentrífuga.

Para la suspensión de células musculares, la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 4.000 rpm, el sobrenadante se retiró y se sustituyó con 500 µl de DMEM que contiene 10 % de suero de caballo inactivado con calor. El sedimento se resuspendió y el tubo se centrifugó durante otros 60 segundos a 2.600 rpm, el sobrenadante se retiró después y se filtró a través de una malla de nylon de 40 micrometros (desechable estéril, marca Falcon). Una muestra de la suspensión celular se inspeccionó al microscopio en este estadio asegurando que tenía la correcta morfología celular y una densidad celular suficiente para la citometría de flujo (las densidades subóptimas se corrigieron mediante dilución o sedimentando y resuspendiendo).

Para la suspensión de células hepáticas, la suspensión se filtró a través de una malla de nylon de 40 micrómetros, se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y se sedimentó como en el músculo. La capa superior del sedimento se retiró cuidadosamente a un tubo limpio con DMEM completo (500 µl), teniendo cuidado de no romper los glóbulos rojos formando una capa distinta y visible en el fondo del sedimento. La suspensión celular se inspeccionó en esta etapa y se ajustó la densidad celular. Si había glóbulos rojos en la preparación celular, se retiraron con una etapa de lisis (incubando las células en 1 ml de tampón de lisis que contiene cloruro amónico 130 mM, Tris 17 mM, bicarbonato sódico 10 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente).

Para la suspensión de células cerebrales, la suspensión se filtró y sedimentó como se ha descrito anteriormente. El sedimento se resuspendió en 250 µl de medio completo de Liebowitz (L-15) que contiene 10 % de suero de caballo y 6 g/l de glucosa, se añadió Percoll produciendo una solución al 50 % (aproximadamente 260-280 µl). La suspensión se centrifugó a 3,5 k durante 5 minutos, tras lo cual la capa superior de las células se retiró cuidadosamente a un tubo de microcentrífuga limpio y se diluyó con al menos 1 ml de medio L-15. Las células se sedimentaron centrifugando a 4.000 rpm durante 5 minutos y después se resuspendieron en un volumen adecuado de L-15.

Se realizó un análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en células de hígado, cerebro y músculo de quimeras. Las suspensiones de células únicas se transfirieron a tubos de poliestireno y se cargaron en un citómetro de flujo para el cual se habían fijado parámetros de operación para detectar el tipo celular concreto de la muestra y que estaba equipado para detectar luz emitida a una longitud de onda verde en respuesta a un haz de láser excitatorio. En cada análisis se analizó al menos un grupo de muestras de una quimera no transgénica con el fin de

fijar el basal para la medición de la fluorescencia (ya que el citómetro de flujo detecta alguna autofluorescencia de cada célula). Estas se denominan muestras control en la figura 21. Los datos producidos por el citómetro de flujo incluyeron el número de células detectadas (en los parámetros especificados) y resumieron la fluorescencia de las células en esta población. Ejemplos de los datos de los análisis del tejido cerebral y muscular se muestran en las figuras 22 y 23, respectivamente. Se recogieron datos para el número de células que exhibieron una intensidad de fluorescencia superior al nivel de autofluorescencia fijado por la muestra no transgénica para cada tipo de tejido (designado M1). Una subpoblación de estos datos se recogió para las células que exhibían una intensidad de fluorescencia al menos diez veces mayor que el nivel de autofluorescencia (designado M2).

Se extrajeron muestras de cerebro, hígado y músculo (de pecho y patas) de seis pollos, de los cuales 18 eran quimeras que se habían producido inyectando células ME de pollo transgénico portadoras del transgén GFP en embriones receptores White Leghorn no transgénicos, como se ha descrito anteriormente. Los 8 pollos restantes eran quimeras que se produjeron inyectando células MEp no transfectadas en embriones receptores White Leghorn no transgénicos. En ambos grupos había pollos machos y hembras, Se detectó fluorescencia verde en células derivadas de cerebro, derivadas de hígado y derivadas de músculo de las quimeras transgénicas. La intensidad de la fluorescencia y la proporción entre células fluorescentes y no fluorescentes varió entre aves y de un tipo de tejido a otro. Los resultados tabulados se muestran en la figura 21. En aves a las que se les había dado una puntuación baja de pigmentación de plumas derivadas del donante o para piel verde cuando se sometieron a cribado con una lámpara UV antes del análisis post-mortem, el número de células fluorescentes en las muestras de tejido era, en general, bajo o cero. Se encontró que las aves con una buena puntuación para estos criterios (p. ej., más del 75 % de plumas derivadas de donante) tenían células fluorescentes en los tres tipos de muestras de tejido y este fue el único grupo en el que había células altamente fluorescentes (M2) en los tres tipos de tejido. De los tres tipos de tejido, el número de células fluorescentes derivadas del hígado fue el más bajo. Las células fluorescentes derivadas de cerebro y de hígado estaban presentes en un número mayor y en un número mayor de muestras derivadas de las quimeras transgénicas. Los datos se muestran gráficamente en la figura 19.

Los datos muestran que las células MEp transgénicas, cuando se inyectan en embriones X en etapa de receptor pueden crecer en el huésped y diferenciarse en células hepáticas, musculares y cerebrales. El hígado, el músculo y el cerebro son tejidos que derivan del endodermo, el mesodermo y el ectodermo, respectivamente; por tanto, las células MEp pueden diferenciarse en los tres linajes de células somáticas importantes de los que derivan las demás células somáticas. Además, este experimento muestra que las células derivadas de MEp transgénicas persisten más allá de las etapas embrionarias y se pueden ver en pollos jóvenes y que el transgén continua expresándose en estos diversos tipos celulares.

El transgén está también presente en linfocitos derivados de células ME. El linaje hematopoyético, que comprende los linajes linfocitoide y mielocitoide, es de particular interés en las quimeras transgénicas derivadas de células ME porque los linfocitos B en el linaje linfocitoide producen anticuerpos. Los linfocitos se preparan a partir de muestras de sangre tomadas de pollos quiméricos en cualquier momento después de la eclosión hasta la etapa adulta o desde la bolsa de Fabricio de los embriones quiméricos. Se extraen las bolsas de los polluelos el día 20 del desarrollo embrionario (E20) y se maceran forzando a través de una malla de acero en 10 ml de solución salina tamponada de Hank (HBSS) con el émbolo de una jeringuilla de 20 ml. Los fragmentos tisulares resultantes y las células se recolectan en un tubo y se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos permitiendo que se fijen los fragmentos grandes. El sobrenadante celular se recoge y las células se cuentan y después se recolectan mediante centrifugación a 1.500 g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspenden a un máximo de 1×10^8 células por ml de HBSS en un tubo cónico de 15 ml. Se extrae sangre (0,5 ml) de las venas de las alas de los pollos quiméricos usando una jeringuilla heparinizada y se deposita en un tubo de vacío que contiene EDTA evitando la coagulación. Las muestras de sangre se mezclan en una proporción 1:1 con HBSS dando un volumen final de 1 ml en un tubo cónico de 15 ml. A partir de este punto, las muestras de sangre y las muestras de la bolsa se tratan del mismo modo. Un ml de la suspensión celular se coloca en subcapa con 0,75 ml de Fico/Lite-LM (Atlanta Biologicals, número de catálogo 1406) dispensando el Fico/Lite en la parte inferior del tubo, debajo de la suspensión celular. Después, se centrifugan los tubos a 1.500 g durante 15 minutos a 4 °C, sin freno. La interfaz entre el Fico/Lite y la HBSS se recoge cuidadosamente recogiendo las células mononucleares que se han concentrado en una capa pequeña de material. Este material se transfiere a un tubo nuevo triturado rompiendo las células compactadas y después se mezclan con 3 ml de HBSS/2 % de suero bovino fetal inactivado con calor. Las células se recogen mediante centrifugación a 1.500 rpm en una centrífuga de mesa Sorvall, 10 minutos a 4 °C, después se lavan dos veces más en HBSS/2 % de FBS. Una pequeña alícuota (25 μ l) se monta en un portaobjetos de microscopio para la evaluación preliminar de la extensión de la fluorescencia GFP derivada de donantes con el microscopio. El resto de las células están listas para tinción o fijación del anticuerpo.

Almacenando las células durante más de unas pocas horas antes del análisis o si se van a montar de forma permanente en los portaobjetos para microscopía, primero se fijan en paraformaldehído. Un alícuota de células (50 μ l, $0,5-1 \times 10^6$ células) se fija mediante la adición de 1 ml de paraformaldehído al 4 % y se incuban a temperatura ambiente durante 1,5 minutos. Después, las células se lavan tres veces mediante centrifugación a 500 g durante 6 minutos en una microcentrífuga recogiendo las células, seguido de resuspensión de las células en PBS/2 % de suero bovino fetal inactivado con calor.

En la tinción de anticuerpos, una alícuota de $0,5 \times 10^6$ células en PBS fresco/2 % de FBS/0,1 % de azida sódica se

- introduce en un tubo o un pocillo de una placa de 96 pocillos en hielo. Los anticuerpos monoclonales conjugados con R-ficoeritrina (Southern Biotechnology Associates) se añaden a las células y se incuban durante 30 minutos en hielo, se cubren protegiendo el fluoróforo. Se usan anticuerpos que reconocen el marcador Bu-1 de linfocitos B (usados en una dilución de trabajo de 0,2 g/10⁶ células) o el marcador CD3 de células T de pollo (usado a 0,5 g/10⁶ células). Después de la incubación, las células se lavan tres veces mediante centrifugación a 500 g durante 6 minutos, resuspendiendo en 0,5 ml de PBS/2 % FBS/0,1 % de azida cada vez. Después del lavado final, las células se almacenan en paraformaldehído al 0,5 % hasta una semana antes del análisis de citometría de flujo. El paraformaldehído se sustituye con PBS/2 % de FBS el día que las células se tienen que analizar mediante citometría de flujo; para la citometría de flujo se usan tampones sin rojo fenol. El análisis FACS se realiza para fluorescencia GFP y fluorescencia con R-ficoeritrina de forma simultánea detectando la proporción total de las células que se derivan de donantes (positivas para GFP), la proporción de células (derivadas tanto de donante como de receptor) que se tiñen con los anticuerpos (positivas para R-ficoeritrina) y la proporción de células derivadas de donantes que también se tiñen con los anticuerpos (dobles positivas para GFP y R-ficoeritrina).
- 15 Las quimeras fabricadas con tres líneas celulares ME diferentes se analizaron determinando la contribución del donante al linaje linfocitario que representa tres etapas de inserción diferentes para el marcador CX-GFP (tabla 10). Se ha analizado un total de 27 quimeras, de edades comprendidas entre pre-eclosión a la edad adulta. La proporción de células derivadas de donante positivas para GFP en la fracción de linfocitos varió de 0 a 10 % según el análisis FACS (los animales con un 0 % no se muestran en la tabla). La tinción de los anticuerpos de los linfocitos de sangre periférica dio como resultado la tinción de un 5-17 % de las células con anticuerpos anti-Bu1 y la tinción de un 75-85 % de las células con anticuerpos anti-CD3. La tinción de los linfocitos de la bolsa con anticuerpos anti-Bu1 dio resultado más del 90 % de las células teñidas. Las células dobles positivas con fluorescencia para GFP y tinción para Bu-1 o CD3 y GFP se observaron a frecuencias bajas en varias de las muestras.
- 25 Estos datos muestran que las células ME conteniendo un gen que codifica una proteína exógena contribuían al linaje hematopoyético en polluelos eclosionados y animales maduros.

Tabla 10: Contribución de las células MEp al linaje de linfocitos en quimeras somáticas.

Quimera	Edad	GFP	Bu-1+	CD3+	GFP+ y Bu-1+	GFP+ y CD3+	Sexo	Plumas	Puntuación verde	Línea celular
OV-36	10	10	ND	ND	ND	ND	F	15	ND	OVF
OV-21	10	7	5	35	0	0	M	0	ND	OVF
10881	67	5	17	75	0,03	1	M	60	3	TB01
10891	49	3	12	74	0	0.1	F	5	1	TB01
10821	111	1	ND	ND	ND	ND	M	75	3	TB01
10877	98	1	11	ND	0,04	ND	F	75	4	TB01
IG1-25	E20	0,2	95	ND	0,03	ND	F	70	ND	BAC A
10845	146	0,18	8,5	ND	0	ND	M	60	3	TB01

- 30 Se encontró que las ocho quimeras enumeradas en la tablas contenían linfocitos derivados de células MEp. Se prepararon linfocitos de sangre periférica (o linfocitos de la bolsa en el caso de la quimera IG1-25) con Fico/Lite-LM como se describe en el texto. Después se analizaron los linfocitos determinando la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP), el aloantígeno asociado con las células B Bu-1 (Bu-1) y el miembro CD3 del complejo CD3 asociado con el receptor de células T (CD3). Los números de las columnas marcadas con GFP, Bu-1 y CD3 indican el porcentaje de células de cada muestra que eran positivas para dichos marcadores mediante análisis FACS (a excepción de OV-36 y 10821, en las que el porcentaje de células fluorescentes con GFP se determinó contando las células bajo el microscopio). La edad de las quimeras cuando se obtuvieron las muestras para analizar se indica en días y se indica el sexo de cada quimera. La columna marcada "Plumas" indica el porcentaje estimado de pigmentación negra de plumas derivadas de células MEp, siendo 75 la cantidad más alta posible de negras (ya que los propios pollos Barred Rock puros tienen un plumaje que es aproximadamente un 75 % negro). La "puntuación verde" es una evaluación subjetiva de fluorescencia verde global en el animal entero visualizado aplicando una lámpara UV manual sobre el animal vivo. La escala va de 0 (no hay verde) a 4 (el máximo verde). Esta puntuación se usa como indicación adicional de la extensión global de la contribución de las células MEp en cada animal. "Línea celular" indica los nombres de las diferentes líneas celulares de MEp usadas generando las quimeras.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un pollo modificado genéticamente que expresa de forma selectiva proteína exógena en células glandulares tubulares, en el que la proteína está codificada por un transgén mayor de 15 kb que está integrado de forma estable en un genoma del pollo y en el que el transgén comprende al menos una porción de un promotor de un gen que codifica ovoalbúmina y en el que dicho promotor está unido operativamente al ADN que codifica la proteína exógena.
- 10 2. El pollo modificado genéticamente de la reivindicación 1, que además comprende al menos una segunda porción de un promotor de un gen que codifica ovoalbúmina que flanquea al extremo 3' del ADN que codifica la proteína exógena.
- 15 3. El pollo modificado genéticamente de la reivindicación 1, en el que la proteína exógena es un anticuerpo monoclonal
- 20 4. El pollo modificado genéticamente de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo monoclonal está compuesto por una cadena pesada humana.
- 25 5. El pollo modificado genéticamente de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo monoclonal es de isotipo IgG.
6. Un huevo de pollo que contiene proteína humana producida por el pollo modificado genéticamente de la reivindicación 1, en el que la proteína humana se produce mediante expresión específica de tejido en células glandulares tubulares del oviducto del pollo modificado genéticamente y en el que la proteína humana está codificada por un transgén integrado de forma estable en el genoma del pollo y en el que el transgén contiene el ADN exógeno que codifica la proteína.
7. El huevo de la reivindicación 6, en el que la proteína humana es un anticuerpo monoclonal.

Fig 1



Fig 2



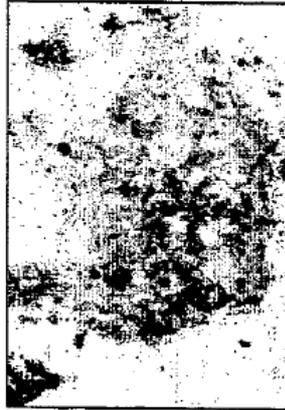
EMA-1



AP



FASE



SSEA-1

Fig.3



Fig 4



Fig 5



Fig 6

pCxGFP/Puro

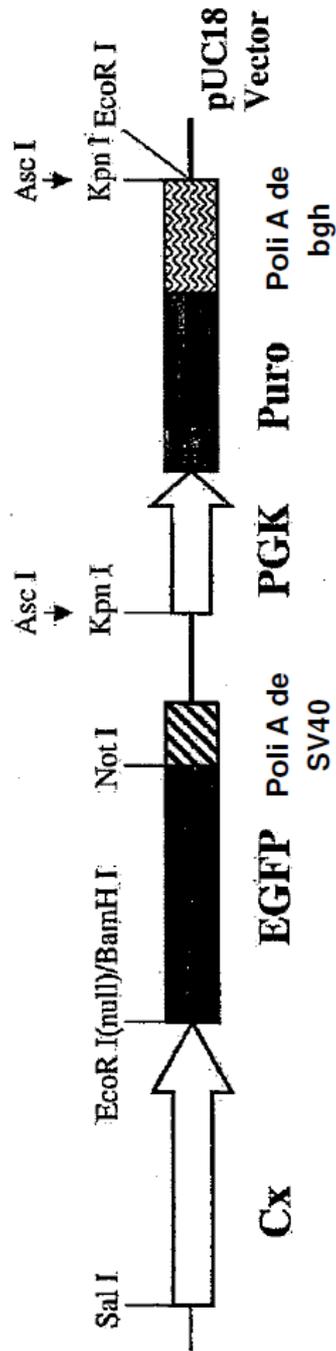
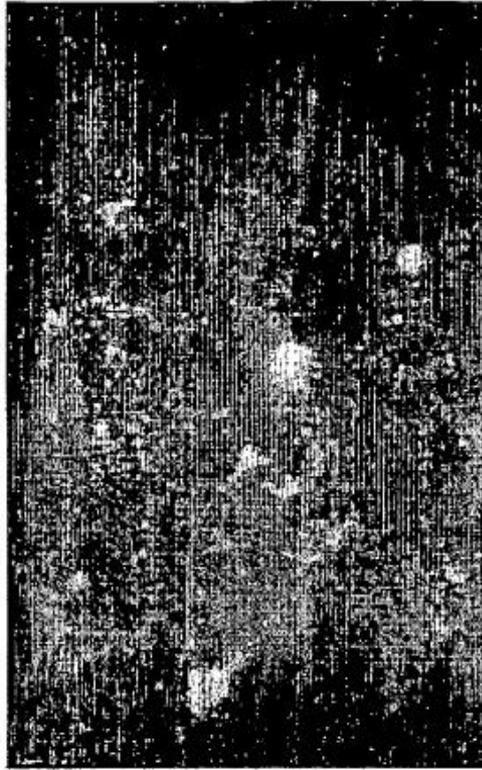
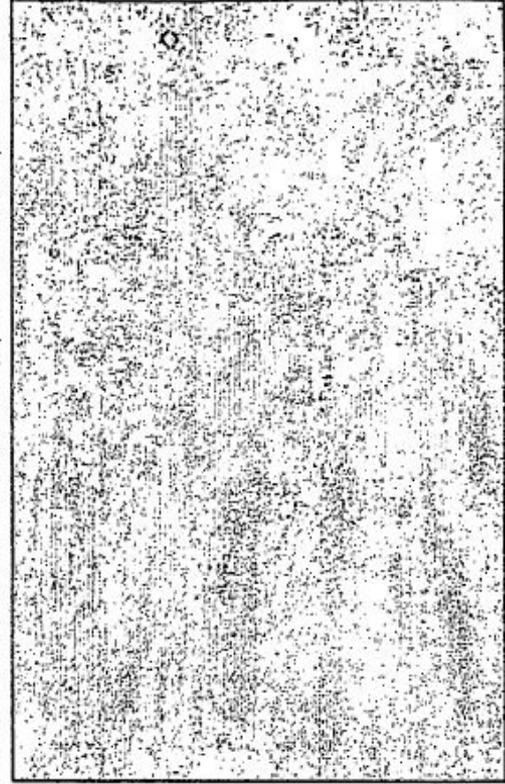


Fig 7

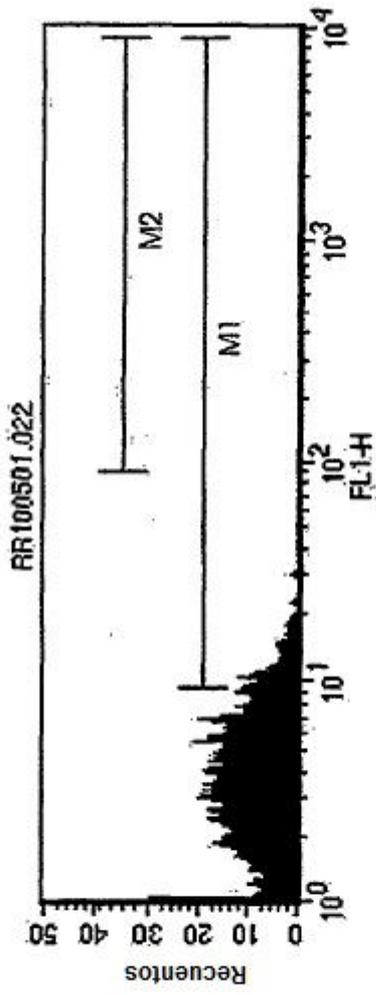


Células ME que expresa EGFP

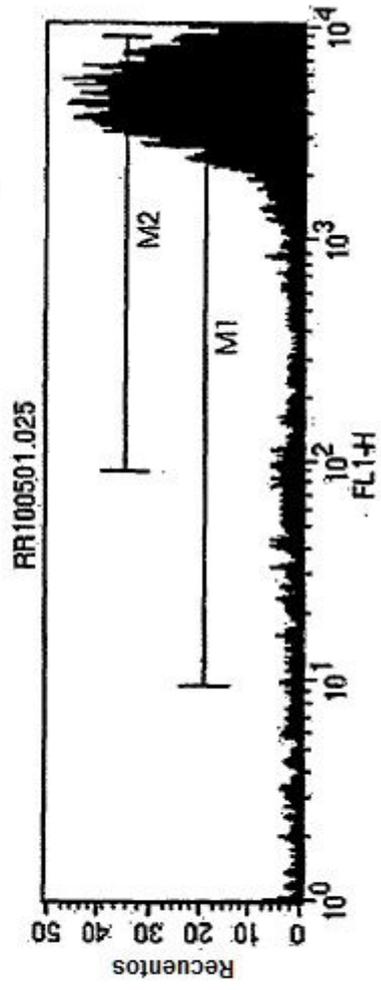


Mismo campo bajo la fase

Fig 8



1.



2.

Fig 9

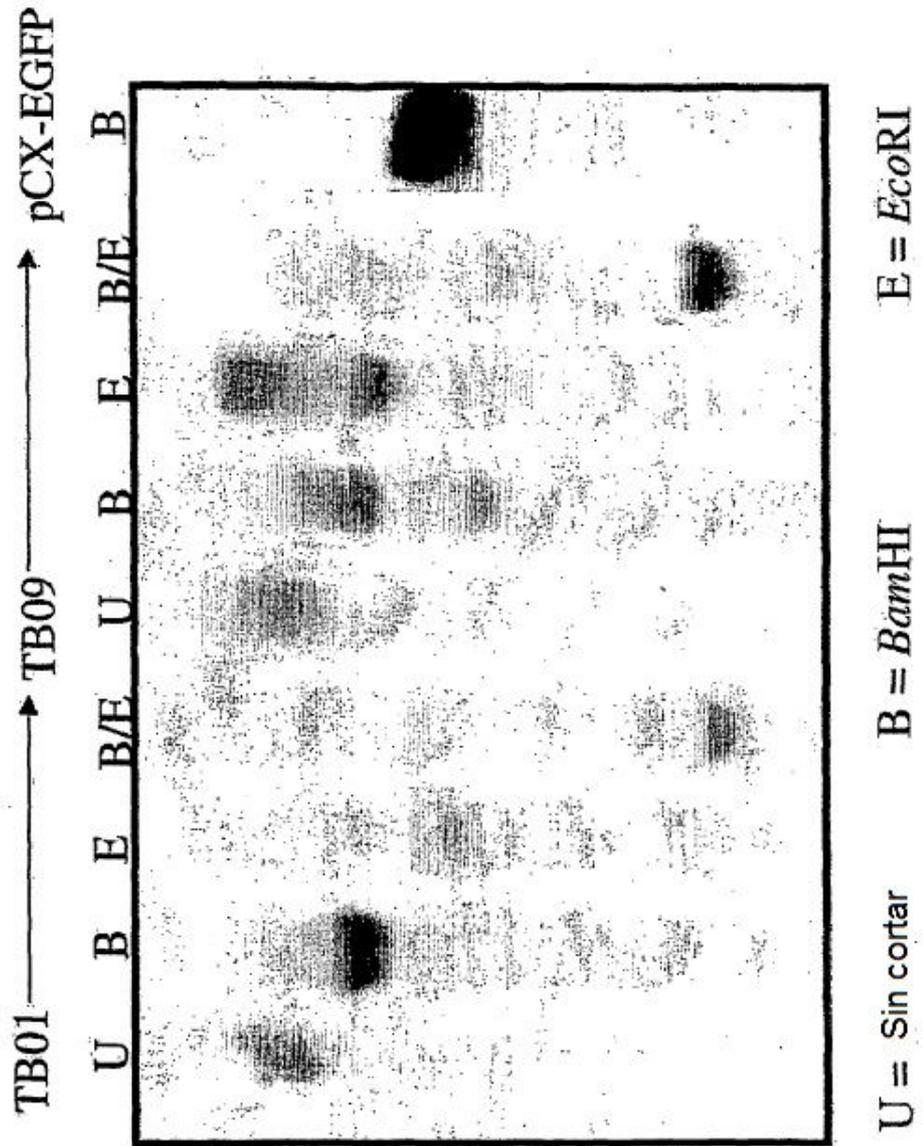
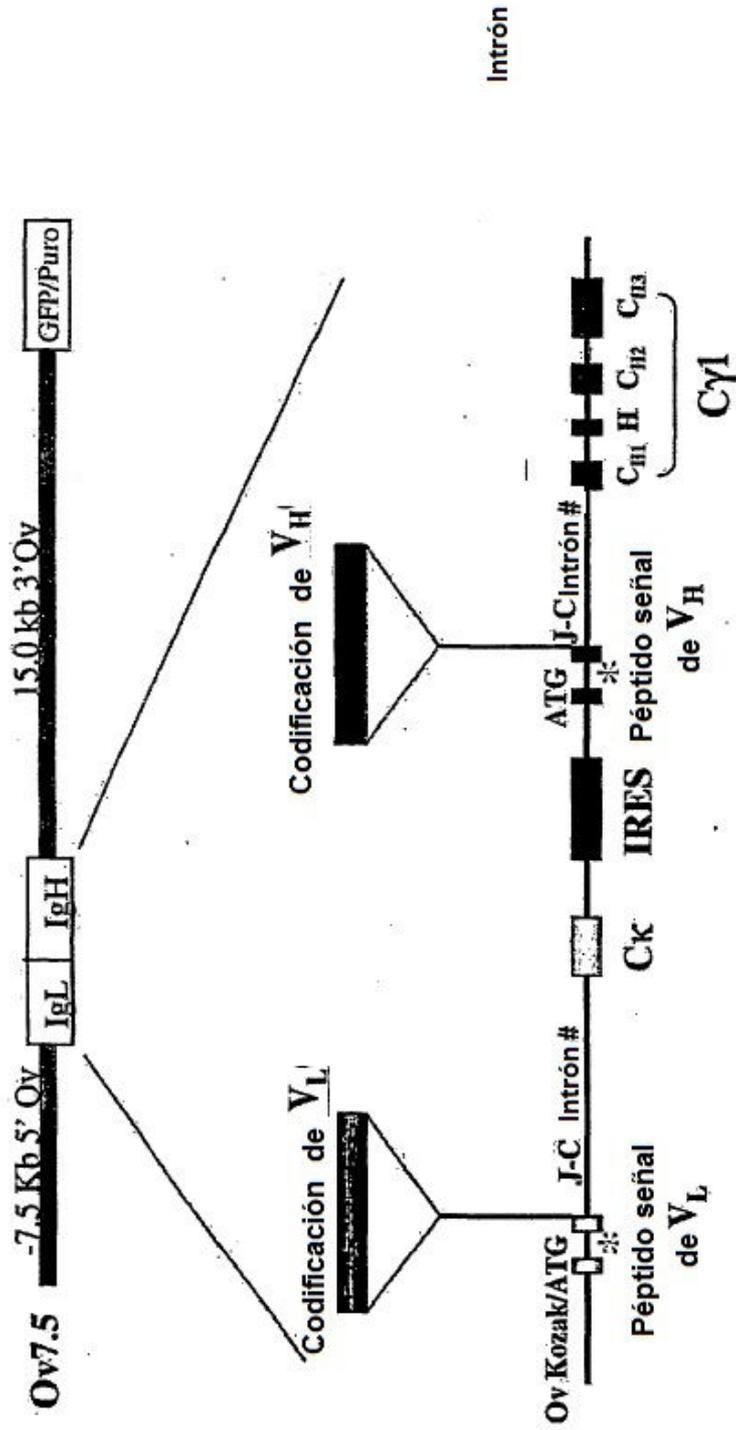


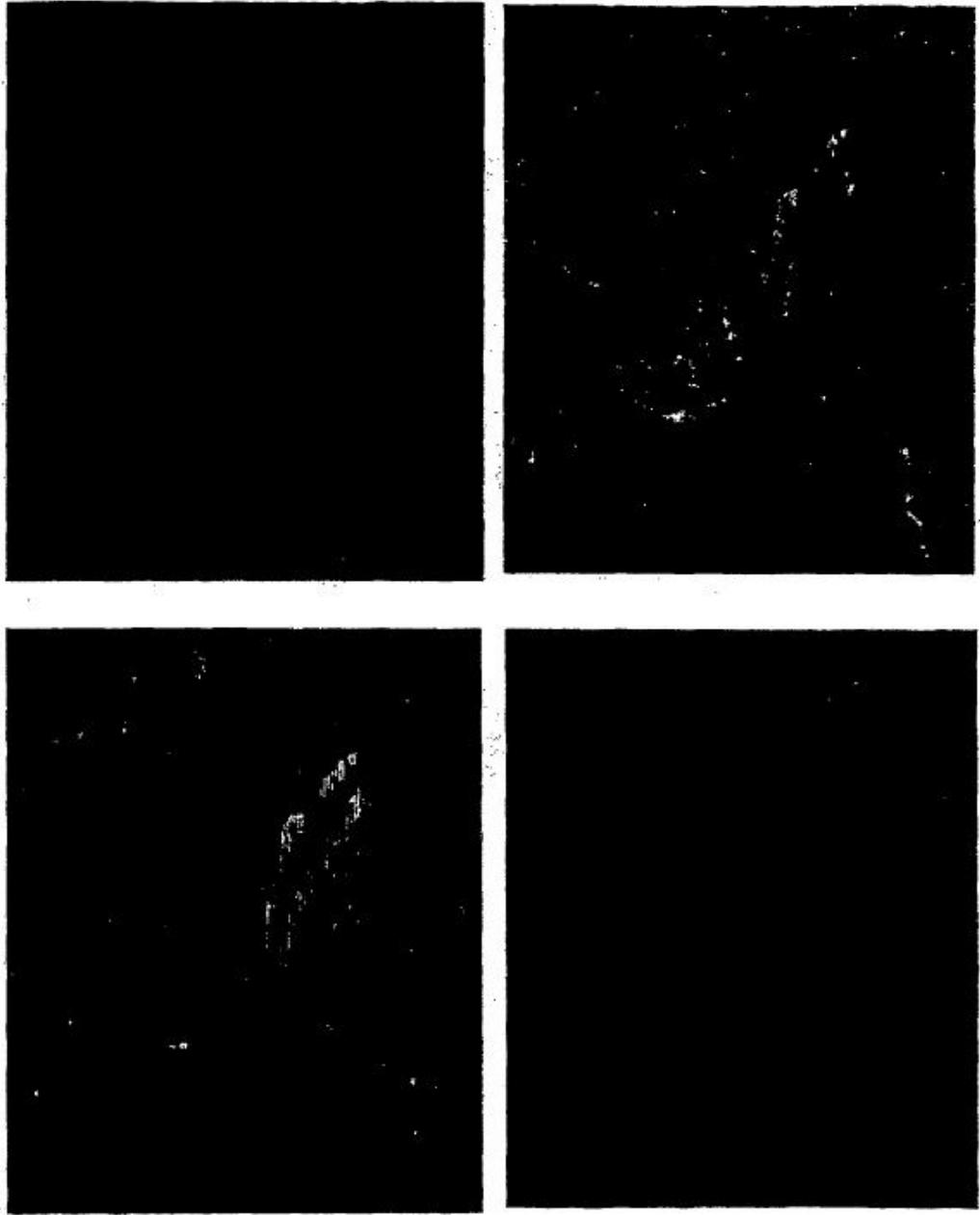
FIG 10A Ov7.5



*: Localización de sitios de restricción sometidos a ingeniería genética

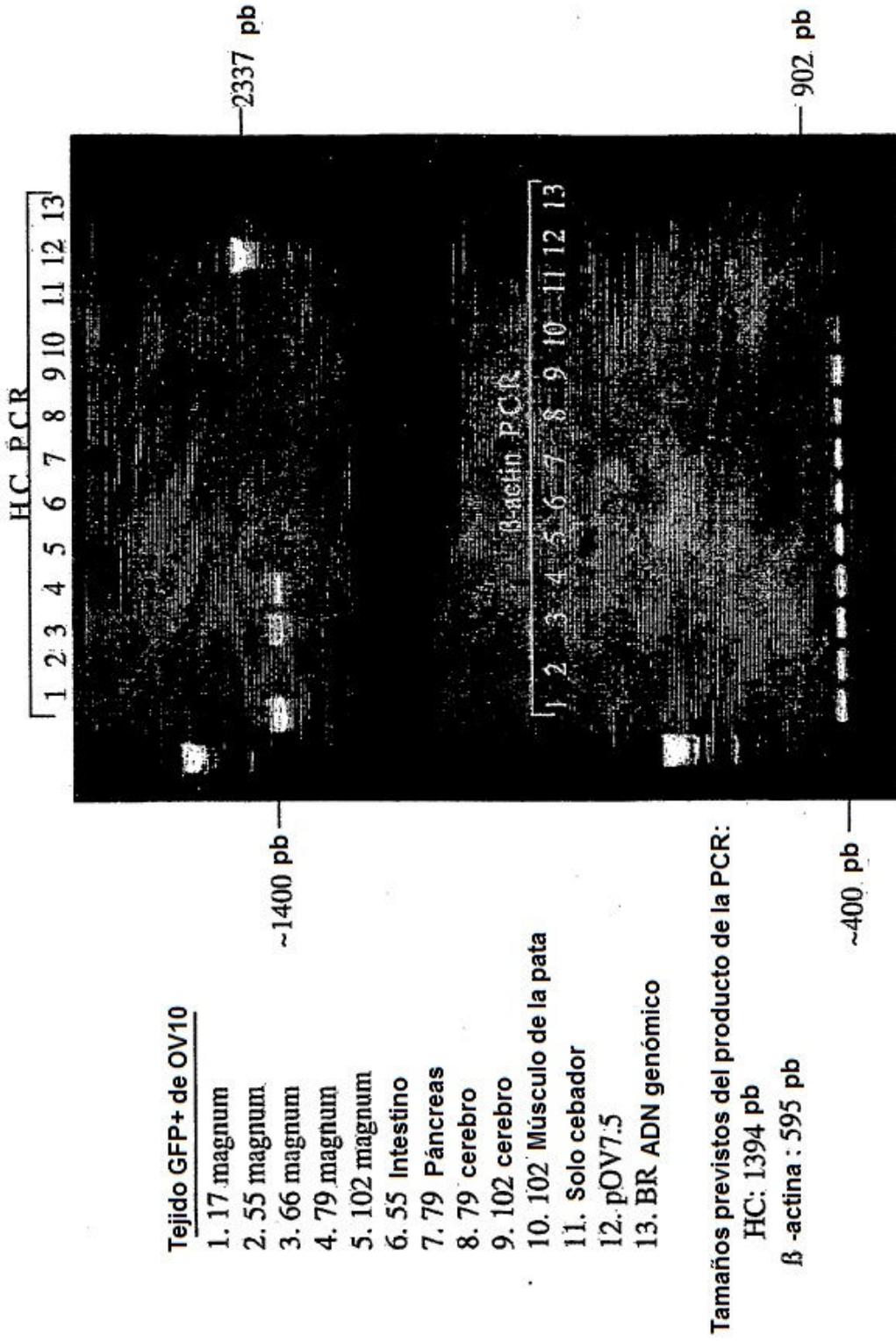
Parte de las secuencias intrón

FIG 10B Expresión de MAbs anti-dansilo en células glandulares tubulares de quimeras hembra de 2 semanas inducida por estrógenos



Experimento RT-PCR de OV10

FIG 10C



Tejido GFP+ de OV10

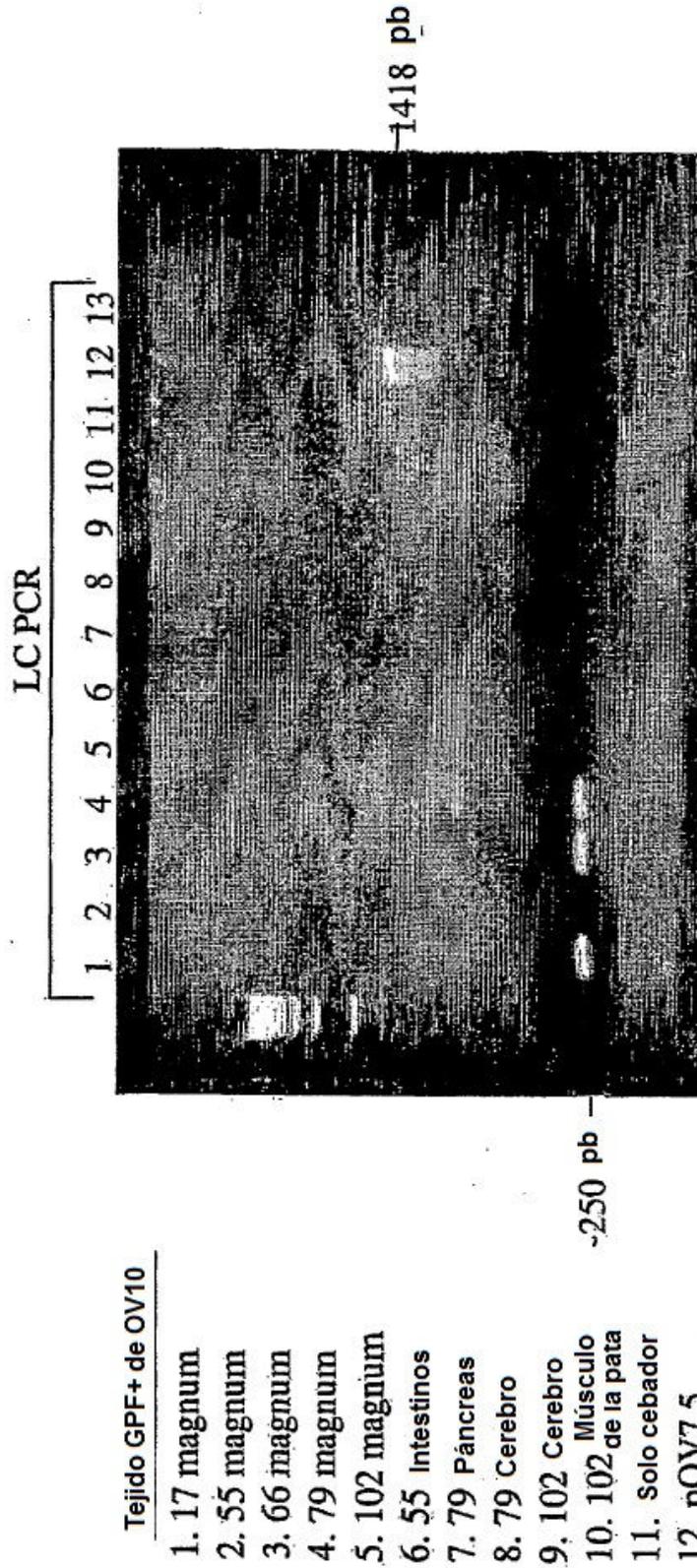
1. 17 magnum
2. 55 magnum
3. 66 magnum
4. 79 magnum
5. 102 magnum
6. 55 Intestino
7. 79 Páncreas
8. 79 cerebro
9. 102 cerebro
10. 102 Músculo de la pata
11. Solo cebador
12. pOV7.5
13. BR ADN genómico

Tamaños previstos del producto de la PCR:

- HC: 1394 pb
 β -actina : 595 pb

Experimento RT-PCR de OV10

FIG 10D



Tamaños previstos de los productos de la PCR:

LC = 561 pb

*LC Problema de corte y empalme = 256 pb

FIG 11

Análisis PCR de células ME BAC-A

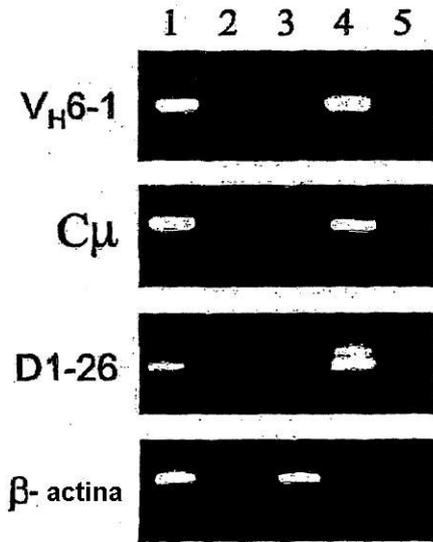


Fig 12

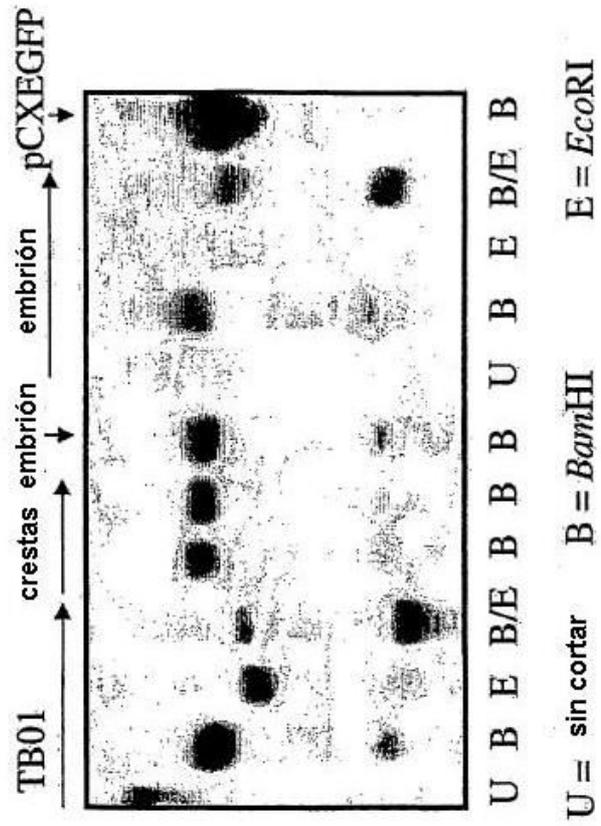


Fig 13



Fig 14

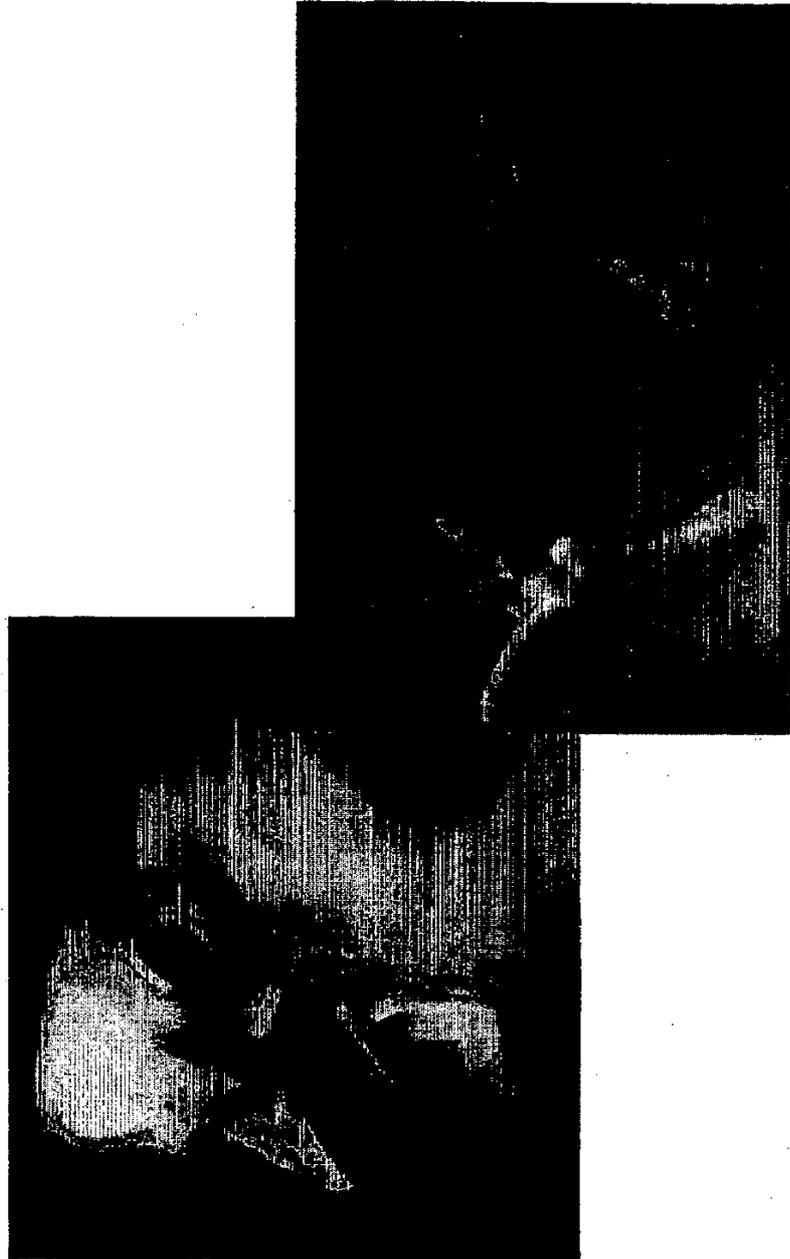




Fig 15



Fig 16



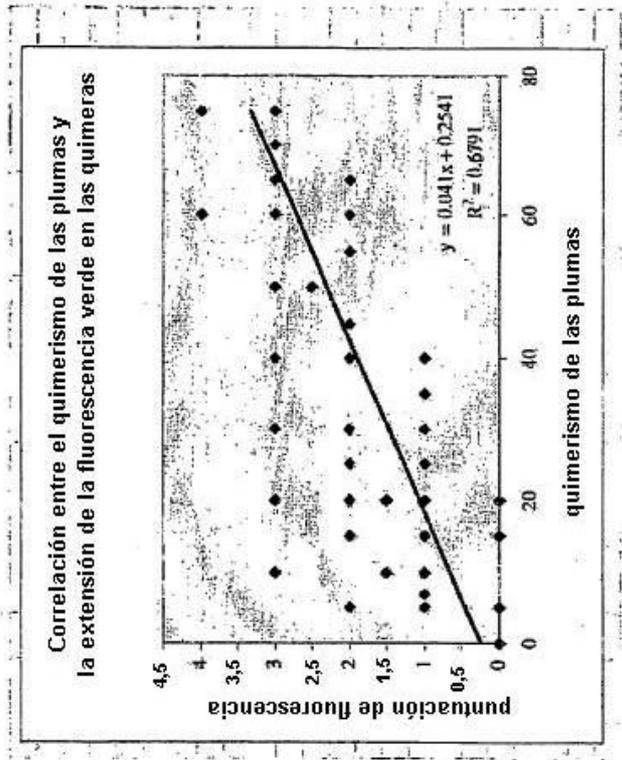
Fig 17



Fig 18



Fig 19



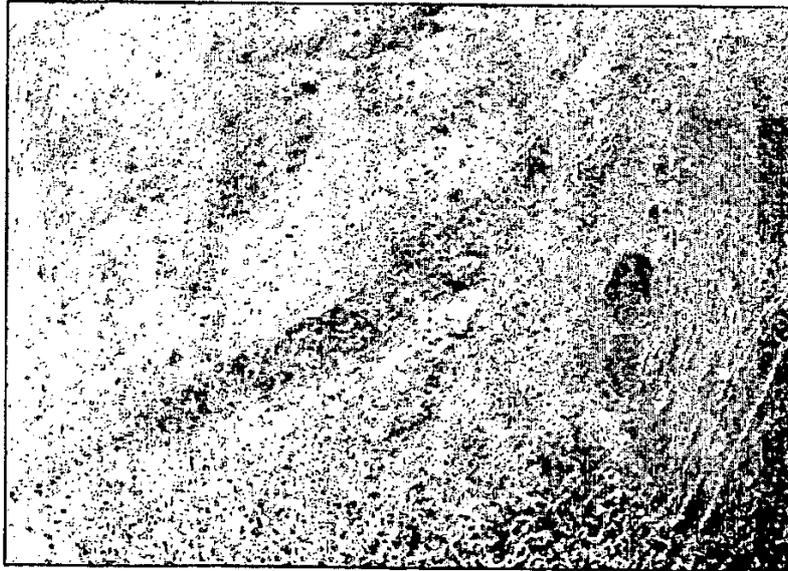
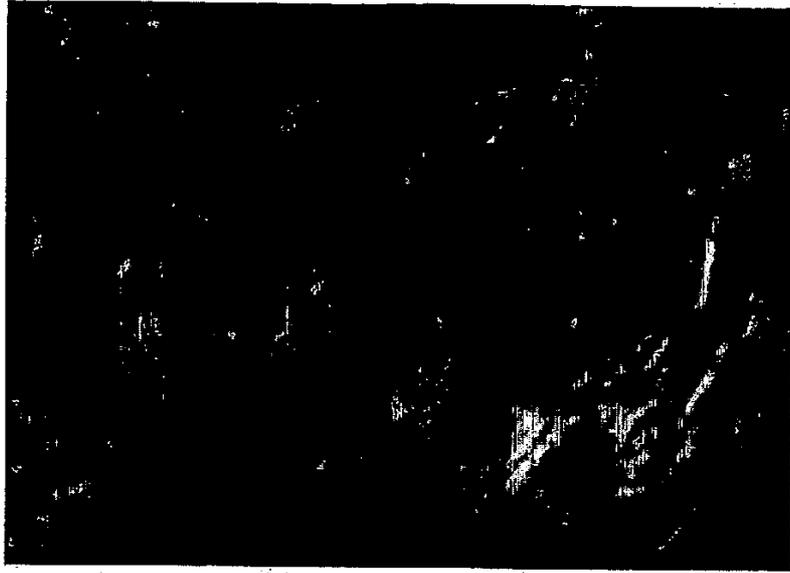


Fig 20

Fig 21

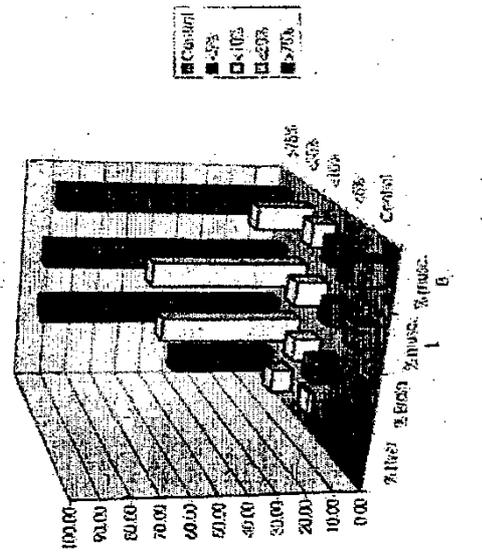
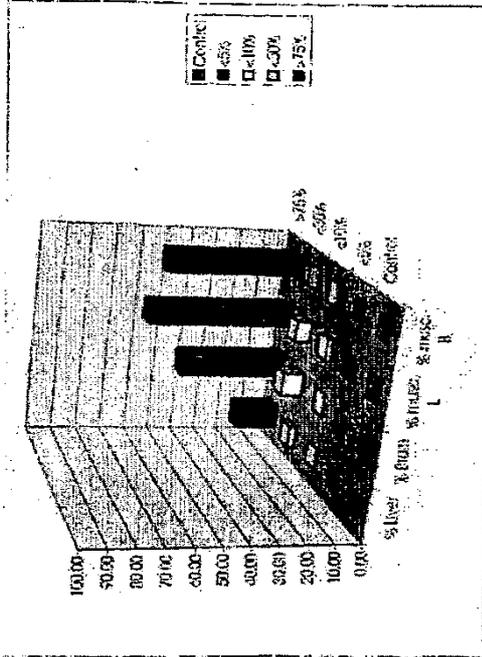
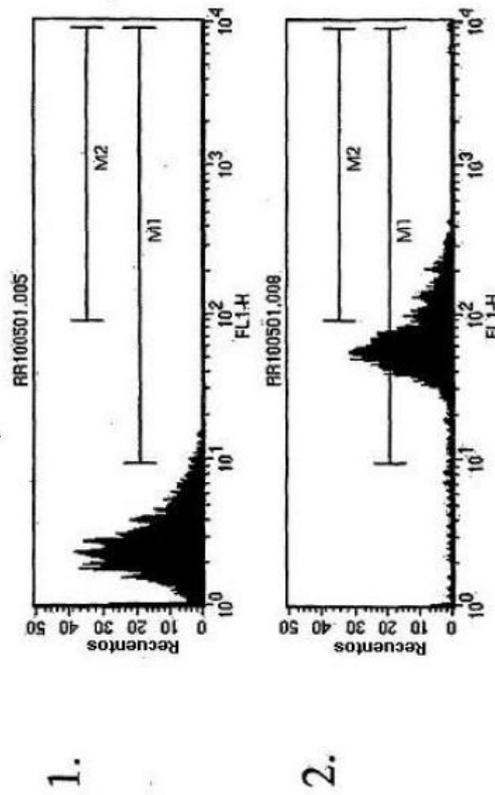


Fig 22



Análisis por citometría de flujo de fluorescencia verde de células de cerebro dispersas de quimeras jóvenes. Recuento celular en el eje y, intensidad de la fluorescencia en el eje x

- 1 - quimeras construidas con células MEp sin transfectar
- 2 - quimeras construidas con células MEp transfectadas establemente con GFP

